

**Methoden zur Integration von Upstream und  
Downstream Processing für Biologics  
hinsichtlich Prozessentwicklung, Digital  
Twin und Process Analytical Technology**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

vorgelegt von

Martin Lukas Kornecki

aus Bad Mergentheim

genehmigt von der Fakultät für Mathematik / Informatik und  
Maschinenbau der Technischen Universität Clausthal,

Tag der mündlichen Prüfung

13. Dezember 2019

Vorsitzender der Promotionskommission

Prof. Dr. rer. nat. Alfred Weber

Institut für Mechanische Verfahrenstechnik

Technische Universität Clausthal

Betreuer

Prof. Dr.-Ing. Jochen Strube

Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik

Technische Universität Clausthal

Gutachter

Prof. Dr. rer. nat. Udo Rau

Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik

Technische Universität Braunschweig

Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik

**Martin Lukas Kornecki**

**Methoden zur Integration von Upstream und  
Downstream Processing für Biologics hinsichtlich  
Prozessentwicklung, Digital Twin und Process  
Analytical Technology**

D 104 (Diss. TU Clausthal)

Shaker Verlag

Düren 2020





## Danksagungen

Die Dissertation entstand während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik an der Technischen Universität Clausthal. Die Zeit in Clausthal-Zellerfeld als auch der Kontakt mit den Menschen dort und vor allem im Institut haben meine persönliche und fachliche Weiterentwicklung geprägt und mich bei der Durchführung der Dissertation unterstützt.

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.-Ing. Strube, der mir als vormaliger externer Biotechnologe die Möglichkeit gab, an seinem Institut zu promovieren. Ich schätze die fachlichen als auch persönlichen Gespräche sehr, die ich während meiner Zeit in Clausthal-Zellerfeld mit Professor Dr.-Ing. Strube hatte. Ich danke für das mir entgegengebrachte Vertrauen zur Organisation und Erweiterung des Labors der biologischen Sicherheitsstufe 1 am Institut. Die zahlreichen vielfältigen und spannenden Aufgaben, Diskussionen und wissenschaftlichen Fragestellungen, die mich fachlich und persönlich weiterentwickelt haben, bedeuten mir sehr viel.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. Rau für die Übernahme des Gutachtens und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Weber für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ich danke herzlich allen Mitarbeitern des Instituts für die stets freundliche, offene und interessierte Zusammenarbeit. Ich danke Frau Claudia Lacheta für die gute Zusammenarbeit und organisatorischen Hilfestellungen. Den technischen Mitarbeitern Frank Steinhäuser, Volker Strohmeyer, Thomas Knebel, Wolfgang Otto, Martina Ketterer und Roland Mecke danke ich insbesondere für ihr Engagement, ihre Einsatzbereitschaft und die spannenden Diskussionen. Ich danke meinen Kollegen Lara Lohmann, Axel Schmidt, Leon Klepzig, Mourad Mouellef, Fabian Mestmäcker, Maximilian Huter, Lukas Uhlenbrock, Dr.-Ing. Petra Gronemeyer, Dr.-Ing. Holger Thiess, Dr.-Ing. Maximilian Sixt und Dr.-Ing. Steffen Zobel-Roos für ihre erfolgreiche, zuverlässige Zusammenarbeit, spannenden wissenschaftlichen und privaten Diskussionen und angenehme

Arbeitsatmosphäre. Dem neuen Kollegen Heribert Helgers wünsche ich viel Erfolg und ich danke ihm für die gute Zeit am Institut.

Ich danke den Studierenden Lisa Sixt, Lara Lohmann, Tianqi Liu, Ahmed Abdallah, Nicolas Ohm und Jan Starke, die durch ihre vorbildliche Unterstützung und guter Zusammenarbeit zu diversen Erfolgen beitrugen.

Ganz herzlichen Dank gilt meiner Familie, die mich während meiner akademischen Ausbildung in Braunschweig und Clausthal-Zellerfeld immens unterstützt und motiviert haben. Durch sie war ich erst in der Lage mich stets weiterzuentwickeln. Ich danke zudem meinen Freunden Mandy Bartelt, Alexander Papamichael und Jannes Kesselhut für deren Verständnis und Unterstützung.

Ich danke insbesondere meiner langjährigen Partnerin Linn von Pein, die mich stets liebevoll motiviert hat und mir verständnisvoll zur Seite stand. Dank ihrer geduldigen Unterstützung habe ich nie den Boden unter meinen Füßen verloren.

Vielen Dank.

Marburg im Februar 2020

Martin Kornecki

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Motivation.....	1
2.	Stand der Technik.....	4
2.1.	Upstream Processing.....	7
2.1.1.	Zelllinienentwicklung.....	7
2.1.2.	Medienkomponenten.....	8
2.1.3.	Verfahrensweisen.....	9
2.1.4.	Bioreaktortypen.....	11
2.2.	Downstream Processing.....	13
2.2.1.	Wässrige Zweiphasenextraktion.....	14
2.2.2.	Säulenchromatographische Trennverfahren.....	15
2.3.	Quality-by-Design.....	20
2.4.	Process Analytical Technology.....	23
2.5.	Modellierung der Kultivierung von Säugetierzellen – Digitaler Zwilling.....	28
2.6.	Konzept der USP-DSP-Integration.....	33
3.	Material und Methoden.....	35
3.1.	Angewandte Methoden der Zellkulturtechnik.....	35
3.2.	Methoden zu Versuchen des Upstream Processing.....	36
3.3.	Methoden zu Versuchen des Downstream Processing.....	38
3.4.	Methoden zur Bioanalytik.....	41
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	44
4.1.	Erweiterte Prozesskontrolle.....	44
4.1.1.	Process Analytical Technology.....	44
4.1.2.	Modellierung der Kultivierung von Säugetierzellen – Digitaler Zwilling.....	54
4.1.3.	Kombination der experimentellen Daten mit dem Prozessmodell.....	65

4.2.	USP-DSP-Integration .....	68
4.2.1.	Einfluss der Medienkomponenten auf die Produktivität .....	68
4.2.2.	Vergleich Fed-Batch zu Perfusion .....	79
4.2.3.	Charakterisierung der NebenkompONENTEN.....	82
4.2.4.	Quality-by-Design .....	93
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	96
6.	Literaturverzeichnis.....	99
7.	Symbolverzeichnis.....	130
7.1.	Abkürzungen.....	130
7.2.	Parameter .....	132
8.	Abbildungsverzeichnis .....	133
9.	Tabellenverzeichnis .....	139
10.	Anhang.....	141



## 1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird die Integration von Upstream (USP) und Downstream Processing (DSP) zur Produktion von Biologics am Beispiel monoklonaler Antikörper vorgestellt.

Die Entstehung und Quantität von Nebenkomponten wie Wirtszellproteine (engl. host cell proteins, HCPs) sowie deren physikochemischen Eigenschaften und die Produktqualität wie die Sekundärstruktur werden im Verlauf des Aufreinigungsprozesses beschrieben und quantitativ erfasst. Mit Hilfe dieser Daten ist eine rationale Prozessentwicklung zur effizienten Abtrennung der Nebenkomponten möglich. Des Weiteren werden für die Prozessentwicklung Prozessmodelle und Quality-by-Design (QbD) basierte Auslegungsverfahren in Kombination mit der Process Analytical Technology (PAT) Initiative anhand einer erweiterten Kontrollstrategie (engl. Advanced Process Control, APC) entwickelt und untersucht. Eine Verknüpfung von spektroskopischen Online-Analysen der Biosuspension mit einem makroskopisch kinetischen Modell der Zellkultivierung soll Prozessvariablen und Modellparameter zugänglich machen, die zuvor nur offline messbar waren, was zu einer erweiterten Kontrollstrategie, einer intensivierten Prozessentwicklung und letztendlich der Erhaltung der Produktqualität im Sinne des QbD-Konzepts führt.

### 1.1. Motivation

Biotechnologisch hergestellte Arzneimittel wie beispielsweise monoklonale Antikörper spiegelten im Jahr 2017 zirka 25 % (208 Mrd. US\$) des weltweiten Umsatzes an verschreibungspflichtigen als auch OTC-Arzneimitteln (engl. over-the-counter, verschreibungsfrei) wider [EvaluatePharma 2018]. Die restlichen zirka 75 % (617 Mrd. US\$) wurden unter anderem mit Hilfe konventioneller Technologien hergestellt. Die Onkologie (104 Mrd. US\$) stellt hierbei neben Antirheumatika (56 Mrd. US\$) und Antidiabetika (46 Mrd. US\$) den dominierenden Therapiebereich dar. Bis zum Jahr 2024 sollen zwei der fünf erfolgreichsten onkologischen Produkte im Form von monoklonalen Antikörpern (Pembrolizumab und Nivolumab) vertreten sein [EvaluatePharma 2018].

Der kommerzielle Erfolg der Antikörper resultierte in einem signifikanten Anstieg in ihrem Produktionsmaßstab [Gagnon 2012]. Kontinuierliche Prozessentwicklungen führten bei gleichbleibenden Volumina und Produktionskosten zu höheren Produktkonzentrationen im USP [Wurm 2004]. Trotz dieser Entwicklung sind neue Herausforderungen und Probleme erkennbar. Diese sind beispielsweise der ökonomische Druck zu kostengünstigen Medikamenten mit gleichbleibender oder verbesserter Qualität als auch ein von Behörden erwartetes, tiefgreifenderes

Verständnis des Herstellungsprozesses und seiner Variationen. Die sich durch die Verbesserungen im USP verändernde Nebekomponentenzusammensetzung erschwert zudem eine effiziente Aufreinigung der Wertkomponente im DSP, was zu einer Verschiebung der Kosten vom USP zum DSP führt [Gronemeyer 2014, Sommerfeld 2005]. Eine systematische Integration des USP und DSP verbessert den Gesamtprozess und beseitigt die neuen Herausforderungen, wie das veränderte HCP-Profil [Gronemeyer 2014, Gronemeyer 2016a, Sommerfeld 2005]. Aus diesem Grund besteht ein stetiger Bedarf an innovativen und effizienten Produktionsprozessen, die höherkonzentrierte Volumenströme handhaben können [Franke 2004, Gronemeyer 2016b, Schmidt 2017, Zobel 2014].

Bei der Betrachtung des signifikanten Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwands zur Charakterisierung, Überwachung und Entfernung der Nebekomponenten und Kontaminanten während des DSP, wäre es lohnend zu analysieren, wie (Art) und in welcher Menge (Quantität) diese entstehen.

Die komplexen Nebekomponenten, wie beispielsweise Wirtszellproteine, Medienkomponenten und Wirtszell-DNA, müssen hierfür anhand ihrer Abtrennbarkeit in kritische, unkritische sowie weniger kritische Nebekomponenten klassifiziert werden. Die quantitative Analyse des DSP soll für eine datengetriebene und gezielte Optimierung des USP mit Hilfe von Medien- und Prozessoptimierungen dienen. Hierdurch soll gezielt die Menge an kritischen Nebekomponenten reduziert oder diese nach Möglichkeit eliminiert werden.

Die rationale Prozessentwicklung basiert auf dem QbD-Prinzip, der als systematischer Ansatz den Schwerpunkt des Qualitäts- und Risikomanagements auf das Produkt- und Prozessverständnis (zum Beispiel den Einfluss von kritischen Prozessparametern auf die Produktqualität) sowie auf die Prozesskontrolle (zum Beispiel die Regelung der Produktqualität durch die Steuerung der kritischen Prozessparameter) legt [Alt 2016, Bechmann 2015, Del Val 2010]. Die PAT-Initiative (engl. Process Analytical Technology) dient hierbei der Messung, Analyse, Überwachung und letztendlich der Kontrolle aller essentiellen Attribute eines Herstellungsprozesses [Hinz 2006]. Diese Attribute sind Prozessparameter (zum Beispiel pH-Wert und Temperatur) als auch Prozessvariablen (zum Beispiel Zellzahlkonzentration, Substrat-/Metabolit-/Produktkonzentration und Produktqualität). Diese Kontrolle der Prozessattribute dient, durch eine Minimierung der Prozessvariation, der Gewährleistung einer chargenunabhängigen Produktqualität und zum Prozessverständnis [Hinz 2006, Paul 2019, Steinwandter 2018].

Prozessmodelle, die die physikochemischen Eigenschaften und Verhalten der Prozesse *in-silico* nachbilden, minimieren den experimentellen Aufwand während QbD-basierter Auslegungsstrategien durch das Ersetzen von Experimenten im Versuchsplan [Abt 2018, Huter

2019, Schmidt 2019, Sixt 2018, Uhlenbrock 2017, Zobel-Roos 2019]. Die Prozessmodelle müssen für prädiktive oder prozessunterstützende Anwendungen jedoch quantitativ validiert sein [Zobel-Roos 2019]. Im Sinne der PAT-Initiative können Prozessmodelle als Kontrollstrategie eingesetzt werden, indem sie Prozessvariablen online bestimmen, die experimentell nur aufwändig online analysiert werden können. Der digitale Zwilling (engl. digital twin) bildet demnach die einzelne Grundoperation und die gesamte Prozesskette *in-silico* nach, mit dessen Hilfe Experimente ersetzt und unterstützt werden können, um eine effizientere Prozessentwicklung im Sinne des QbD-Konzepts zu generieren [Bruynseels 2018, Kritzingen 2018, Rosen 2015, Zobel-Roos 2019]. Der besondere Wert des digitalen Zwillings ergibt sich aus der Möglichkeit den realen Zwilling unter jedem prozesstechnisch relevanten Aspekt zu simulieren, um Effekte, Optimierungen und Risiken über den gesamten Lebenszyklus zu analysieren [Boschert 2016, Kritzingen 2018].

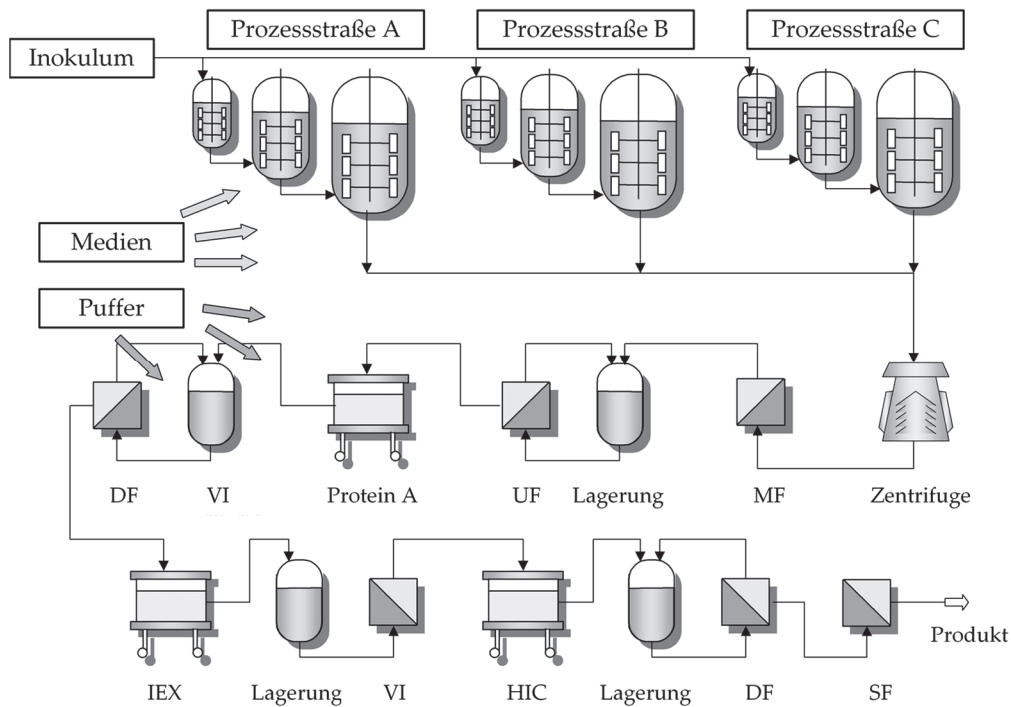
Die Kombination aus einer erweiterten Prozesskontrolle (APC), die auf PAT-Methoden und Prozessmodellen (digital twin) basieren sowie der rationalen USP-DSP-Integration soll die Effizienz der Produktion von Biologics als auch das Prozessverständnis erhöhen und nach dem QbD-Konzept eine konsistente hohe Produktqualität ermöglichen.



## 2. Stand der Technik

Die biotechnologische Produktion von Biopharmazeutika wird in die Bereiche USP und DSP eingeteilt. Die rekombinante Produktion der Zielkomponente in Bioreaktoren wird dem USP zugerechnet. Das sich dem USP anschließende DSP verwendet unter anderem Membran-, Chromatographie- oder Extraktionsverfahren, um die Hauptkomponente von Nebenkomponten wie den Wirtszellproteinen (engl. host cell proteins, HCPs) zu trennen. Während der Produktion der rekombinanten Proteine mittels geeigneter Wirtszellen werden eine hohe volumetrische Produktivität ( $\text{mg}_{\text{Produkt}} \text{L}_{\text{Bioreaktor}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) und Produktqualität angestrebt. Hierbei sind erweiterte Prozesskontrollstrategien im USP notwendig, um die für die Wirtszellen nötigen Umgebungsbedingungen zu schaffen und konstant zu halten. Die anschließende Abtrennung der Nebenkomponten im DSP basiert auf dem Zusammenspiel der Leistungsparameter Auflösung, Geschwindigkeit, Kapazität und Rückgewinnung in den einzelnen Verfahrensschritten [GE Healthcare 2010]. Eine genaue Kenntnis der abzutrennenden Nebenkomponten und ihrer physikochemischen Eigenschaften ist für die Auslegung und Prozessführung des DSP essentiell [Bracewell 2015, Goey 2018, Tait 2012, Valente 2015, Wang 2009].

Der in Abbildung 1 gezeigte plattformbasierte Referenzprozess zur Herstellung monoklonaler Antikörper umfasst Verfahrensschritte wie die Kultivierung der Organismen in Suspension, Zentrifugation, Mikro- und Ultrafiltration, Protein A Affinitätschromatographie, orthogonale Virusabreicherungsschritte, Ionenaustausch- (IEX) und hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) [Fröhlich 2012, Gronemeyer 2014, Grote 2011, Shukla 2007, Sommerfeld 2005].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des plattformbasierten Herstellungsprozesses monoklonaler Antikörper nach Sommerfeld [2005]. DF, Diafiltration; VI, Virusinaktivierung; UF, Ultrafiltration; MF, Mikrofiltration; IEX, Ionenaustauschchromatographie; HIC, hydrophobe Interaktionschromatographie; SF, Sterilfiltration.

Das Downstream Processing beginnt nach der Kultivierung und beinhaltet gewöhnlich die Prozessschritte

1. Vorbereitung beziehungsweise Klärung (engl. preparation, clarification),
2. Isolierung (engl. capture),
3. Zwischenreinigung (engl. intermediate purification) und
4. Feinreinigung (engl. polishing) [Chmiel 2011].

Die Trennung der Partikel (Zellmasse) von der wässrigen Phase erfolgt während der Vorbereitung beziehungsweise Klärung. Die Trennaufgabe besteht in der vollständigen Entfernung von Partikeln, um das Produkt anschließend während des capture zügig zu isolieren, stabilisieren und konzentrieren. Während der Isolierung erfolgt die erste Aufreinigung des Zielmoleküls aus der vorgeklärten Ausgangslösung. Während des intermediate purification werden weitere Nebenkomponten abgetrennt. Das Zielprodukt wird während dieses Prozessschritts weiter aufgereinigt und konzentriert. Zuletzt erfolgt die endgültige Entfernung von Kontaminanten, Einstellung des pH-Wertes, Salzkonzentration und Additiven während des polishing, um den Wirkstoff mit der geforderten Reinheit zu erhalten und dessen Lagerfähigkeit zu gewährleisten [Chmiel 2011].

Für eine Charakterisierung der einzelnen Prozessschritte werden die spezifischen Leistungsparameter Auflösung, Geschwindigkeit, Kapazität und Rückgewinnung verwendet [GE Healthcare 2010]. Die Zielsetzung variiert je nach Prozessschritt und verursacht je nach Trennaufgabe unterschiedliche Herausforderungen, die während der Prozessoptimierung adressiert werden müssen. Die Protein A Affinitätschromatographie beispielsweise, welche als Isolierungsschritt nach einer anfänglichen Klärung der Biosuspension eingesetzt wird, wird mit weiter ansteigenden Produktkonzentrationen ein Kapazitätsmaximum erreichen [Gronemeyer 2014]. Das wird eine zu lösende Herausforderung sein, da dieser Leistungsparameter neben Geschwindigkeit charakteristisch für diesen Prozessschritt ist [GE Healthcare 2010].

Zusätzliche Herausforderungen bei der selektiven Trennung während der Zwischen- und Feinreinigung verhindern das Erreichen der charakteristischen Leistungsmerkmale des jeweiligen Prozessschrittes und mindern somit die Effizienz des DSP.

## 2.1. Upstream Processing

Die Produktion der 76 monoklonalen Antikörper, welche von der EMA (engl. European Medicines Agency, Europäische Arzneimittelagentur) und FDA (engl. U. S. Food and Drug Administration, US-amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel) im Jahr 2017 zugelassen waren, wird zu zirka 51 % mit Hilfe der tierischen Zelllinie CHO (Chinese hamster ovary) durchgeführt [ACTIP 2017]. Die restlichen Antikörper und -fragmente werden von NS0 (murines Myelom), Hybridoma (B-Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert), Sp2/0 (murines Myelom) und *Escherichia coli* Zellen hergestellt. Neben antikörperbasierter Arzneimittel und Diagnostika stellen virale Vakzine etablierte Produkte dar, die mit Hilfe tierischer Zellen hergestellt werden [Fuenmayor 2017, Kramberger 2015, Kushnir 2012]. Des Weiteren eröffnet die regenerative Medizin sowie die Gen- und Zelltherapie neuartige Forschungsbereiche, mit neuen Herausforderungen und Potential zur Prozessoptimierung [Aiuti 2017, Forsberg 2018, Kramberger 2015, Ramqvist 2007, Warnock 2006]. Prozessstrategien zur optimalen Kultivierung der Organismen zielen in der Regel auf eine Erhöhung der Zellzahlkonzentration, volumetrischen Produktivität und Produktqualität ab. Die Prozessstrategien umfassen die Bereiche

- der Zelllinienentwicklung,
- Medienkomponenten,
- Verfahrensweisen,
- Bioreaktortypen,
- Prozesskontrolle und
- Prozessanalytik [Agarabi 2016, Birch 2006, Chotteau 2015, Fletcher 2005, Gronemeyer 2014, Jain 2008, Li 2010, Möllerl 2015, Omasa 2010, Zhang 2010].

### 2.1.1. Zelllinienentwicklung

Die Zelllinienentwicklung umfasst im Wesentlichen die Aspekte der Herstellung eines Expressionsvektors, welches unter anderem das zu exprimierende Gen beinhaltet, dessen Transfektion in ein geeignetes Expressionssystem (Zelllinie) und die daran anschließende Selektion eines passenden Zellklons [Hong 2018, Li 2010, Rita Costa 2010]. Die Klonselektion wird anhand verschiedener Kriterien durchgeführt. Zu diesen Kriterien zählen die reproduzierbare, stabile Expression des gewünschten Gens bei gleichbleibender Produktqualität, hohe volumetrische Produktivität und optimale Wachstumscharakteristika wie beispielsweise eine für die Zelllinie typische oder erhöhte Wachstumsrate  $\mu$ , eine langanhaltende hohe Zellviabilität und die Möglichkeit zur Adaption an serumfreie Medien in Suspensionskulturen [Birch 2006].

---

Methoden zur Zelllinienentwicklung umfassen des Weiteren die gezielte Veränderung der Stoffwechselwege (engl. metabolic engineering) und des Expressionsvektors [Birch 2006] als auch die Verbesserung der Produktqualität, wie das Glykosylierungsprofil des rekombinanten Proteins [Butler 2014, Gupta 2018, Sha 2016].

Die Prozessentwicklung hinsichtlich Bioreaktordesign und -steuerung als auch der Medienkomponenten sind neben der eigentlichen Zelllinienentwicklung die Schlüsselp Parameter für die erfolgreiche Implementierung eines kommerziellen, zellkulturbasierten Prozesses [Agarabi 2015, Kiss 2018, Nelson 1991, Pollock 2013, Reinhart 2015, Tapia 2016].

### 2.1.2. Medienkomponenten

Die Entwicklung und Optimierung des Kultivierungsmediums nimmt in der Prozessentwicklung der *in-vitro* Kultivierung eine zentrale Rolle ein. Investitionen in die Medienentwicklung für jeden einzelnen Prozess sind leicht zu rechtfertigen, da die nährstoffbezogenen Anforderungen für die Kultivierung prozessspezifisch sind und der Einfluss der Medienkomponenten auf die Prozessleistung signifikant ist [Fletcher 2005].

Die Basis der heutigen kommerziellen Medien ist das Basalmedium, dem je nach biotechnologischer Zielsetzung (Stammhaltung, Produktion) weitere Komponenten hinzugefügt werden. Das Basalmedium ist eine isotone Salzlösung, die die intrazellulären Ionen- und Elektrolytkonzentrationen des jeweiligen Organismus extrazellulär nachbilden [Gstraunthaler 2013]. Vollmedien bestehen aus einem Basalmedium, dem Glucose und andere Kohlenhydrate, Aminosäuren, Vitamine, Lipide sowie Spurenelemente hinzugefügt worden sind [Gstraunthaler 2013]. Darüber hinaus werden Medien in der Zellkultur Seren hinzugefügt, welche Tieren (Rind, Pferd, Schwein, Ziege) in verschiedenen Entwicklungsstadien und Alter entnommen wurden (zum Beispiel fetales Kälberserum). Der Vorteil der Verwendung von Seren ist die Vielzahl an Komponenten, die das Wachstum der Zellen positiv beeinflussen. Des Weiteren besitzen Seren eine verbesserte Pufferwirkung sowie über optimierte Bindungs- und Transportproteine, die die Aufnahmerate von Nährstoffen der Zelle verbessern. Nachteile und unerwünschte Nebeneffekte sind das Vorhandensein schwankender Inhaltsstoffe und einer verminderten Reproduzierbarkeit, wachstumsinhibierender Bestandteile als auch Kontaminationen mit Erregern, wie der Bovine spongiforme Enzephalopathie in Rinderseren. In pharmazeutischen Produktionsprozessen werden tierische Rohstoffe generell vermieden [Al-Rubeai 2015, Gstraunthaler 2013, Wagner 2015].

Aus diesem Grund wurden Basalmedien bis hin zu chemisch definierten Medien entwickelt, die keine tierischen Komponenten enthalten. Hierdurch wird die Prozessvalidierung vereinfacht, der

Aufwand der Aufreinigung verringert und eine erhöhte Reproduzierbarkeit ermöglicht [Wagner 2015].

Die Strategien für die Medienentwicklung können wie in Tabelle 1 ersichtlich zusammengefasst werden. Diese können nach Durchsatz, Repräsentation der Realität, Informationsgewinn (Prozessverständnis) und Geltungsbereich (Grenzen der Strategie) charakterisiert werden.

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Strategien für die Medienentwicklung nach Fletcher [2005].

Charakteristikum	Komponenten- titration	Mischung versch. Medien	Analyse des verbrauchten Mediums	Automatisiertes Screening
Durchsatz	Gering	Hoch	Mittel	Hoch
Repräsentation	Hoch	Hoch	Hoch	Gering
Informationsgewinn	Hoch	Gering	Hoch	Mittel
Geltungsbereich	Unbegrenzt	Begrenzt	Begrenzt	Unbegrenzt

Eine rationale Medienentwicklung verwendet mehrere, komplementäre Strategieansätze, um die Anforderungen an die Prozessentwicklung erfüllen zu können. Basierend auf Tabelle 1, umfasst die Entwicklung im Allgemeinen

- das Screening (Automatisiertes Screening, Mischung verschiedener Medien),
- die Optimierung (Automatisiertes Screening, Mischung verschiedener Medien, Analyse des verbrauchten Mediums) und
- Validierung (Analyse des verbrauchten Mediums) [Fletcher 2005, Ryder 2018].

### 2.1.3. Verfahrensweisen

Grundsätzlich für alle biotechnologischen Prozesse kann die Verfahrensweise der Bioreaktoren in diskontinuierlich (Batch, Repeated Batch oder Fed-Batch) und kontinuierlich (Chemostat, Perfusion) klassifiziert werden [Al-Rubeai 2015]. Das für die Produktion monoklonaler Antikörper am häufigsten angewandte Verfahren ist das Fed-Batch-Verfahren bis zu 20.000 L Bioreaktorvolumen [Al-Rubeai 2015, Birch 2006, Pollock 2013], wobei auch kontinuierliche Perfusionsverfahren industriell bis zu einem Maßstab von 2.000 L Bioreaktorvolumen eingesetzt werden [Chotteau 2015, Pollock 2013]. Das allgemeine Ziel der Verfahrensentwicklung ist das Erreichen einer bestmöglichen Kombination der Parameter

- Erhaltung der Produktqualität,
- Reduzierung der Prozesszeit und

- Reduzierung der Investitionsausgaben (engl. capital expenditure, CAPEX) [Rathore 2018, Thiess 2017a].

Eine Art der diskontinuierlichen Verfahrensweise ist das Batch-Verfahren, bei dem die Flüssigphase bis auf die Zugabe von pH-Korrekturmitteln oder Entschäumer während der Kultur konstant ist. Zu Beginn der Kultivierung werden die Zellen aus einer Vorkultur und frisches Medium in einen Bioreaktor gegeben, in dem die Zellen wachsen und das Produkt herstellen. Am Ende der Kultivierung wird der gesamte Behälter entleert [Chmiel 2011]. Die Kultivierungszeit bei Batch-Kulturen beträgt je nach Zelllinie und Produkt etwa vier bis fünf Tage, wobei Zellzahlkonzentrationen von etwa  $10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ , und eine Produktkonzentration von  $200 \text{ mg L}^{-1}$  erreicht werden können [Al-Rubeai 2015, Chmiel 2011]. Batch-Prozesse gelten als robuste, einfach integrierbare Standardverfahren im Labormaßstab, da Eingriffe in die Kultivierung minimiert werden. Die geringen Zellzahlkonzentrationen und dementsprechend geringere Produktkonzentrationen zum Zeitpunkt der Zellernte stellen Grenzen des Batch-Verfahrens dar.

Eine weitere Verfahrensweise ist die kontinuierliche Kultivierung, bei der kontinuierlich Kultivierungsmedium aus dem Reaktor entfernt und durch neues Nährmedium ersetzt wird. Durch geeignete Zellrückhaltesysteme wie Filter, Hydrozyklone, akustische Abscheider oder schwerkraftbasierte Abscheider verbleiben die Zellen im Bioreaktor, wodurch signifikant höhere Zellzahlkonzentration erreicht werden [Pollock 2013]. Der kontinuierliche Austausch des Mediums im Reaktor verhindert die Anreicherung von toxischen Stoffwechselprodukten wie Lactat oder Ammonium und gewährleistet konstante Bedingungen für das Wachstum der Zellen über die gesamte Dauer der Kultivierung. Es können abhängig von Zelllinie, Produkt und Durchflussrate (Quotient aus Volumenstrom Ein-/Austritt und flüssigem Bioreaktorvolumen) Zellzahlkonzentrationen von  $10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  bei einer Kultivierungsdauer von mehreren Monaten erreicht werden, was jedoch entsprechend mit einem hohen Medienverbrauch einher geht [Bielser 2018, Chmiel 2011, Mercier 2016]. Der Vorteil von kontinuierlichen, konstanten Bioprozessen (engl. continuous bioprocessing, CPB) ist eine konstante Prozessführung sowie eine erhöhte volumetrische Produktivität ( $\text{g}_{\text{Produkt}} \text{ L}_{\text{Bioreaktor}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), die zu kleineren Bioreaktorvolumina führt, wodurch Prozessanlagen kosteneffizient und mit kleinerer Grundfläche hergestellt werden können [Croughan 2015, Farid 2019, Rathore 2018, Warikoo 2012]. Zusätzlich wird durch die eingestellte Durchflussrate von üblicherweise  $1$  bis  $5 \text{ h}^{-1}$  [Bielser 2018, Karst 2016, Warikoo 2012] eine verminderte Verweilzeit des Produkts innerhalb des Bioreaktors erreicht, wodurch die Produktqualität durch eine zeitnahe Prozessierung des Zielmoleküls erhalten bleibt [Chotteau

2015]. Fragestellungen, die jedoch bei der kontinuierlichen Prozessführung adressiert werden müssen, sind

- verminderte Homogenität in einem kontinuierlichen, gerührten Reaktor,
- Standzeit und Erhalt der Sterilität,
- mangelnde kurzfristige Flexibilität durch längerer Prozesszeiten,
- hohe Betriebskosten (engl. operational expenditure, OPEX) durch signifikant höheren Medienverbrauch,
- längere Prozessentwicklung im Labormaßstab durch längere Prozesszeiten und
- genetische Instabilität der kultivierten Zellen [Croughan 2015].

Neben dem kontinuierlichen und Batch-Verfahren existieren noch halboffene Systeme, bei denen mit einem Batch-Prozess begonnen wird, aber im Verlauf der Kultivierung neues Medium in Intervallen hinzugefügt (Feed-Medium) und/oder Suspension entnommen wird. Eine verbreitete Form der halboffenen Kultivierung ist der Fed-Batch-Prozess, bei dem im Verlauf der Kultur konzentriertes Feed-Medium hinzugegeben, aber keine Suspension entnommen wird. Dies kann genutzt werden, um zu hohe Ausgangskonzentrationen an Nährstoffen zu vermeiden, die zu unerwünschten Nebenprodukten führen können oder das Wachstum inhibieren [Al-Rubeai 2015, Chmiel 2011]. Bei einer Kultivierungszeit von zwei bis drei Wochen können je nach Zelllinie und Produkt Zellzahlkonzentration von über  $10^7$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  und eine Produktkonzentration von  $10 \text{ g L}^{-1}$  erreicht werden [Al-Rubeai 2015, Birch 2006, Chmiel 2011, Jain 2008, Li 2010]. Die im Vergleich zum simplen Batch-Verfahren höheren Zellzahl- und Produktkonzentrationen im Fed-Batch-Prozess sind die Ursache für die breite Verteilung dieser Verfahrensweise [Birch 2006, Pollock 2013]. Des Weiteren eröffnet die Kombinationen an Feed-Medien (zum Beispiel Zeitpunkt der Zugabe, Menge, Art) und Prozessführungen (zum Beispiel Temperaturerniedrigungen) weitere Strategien zur Prozessentwicklung [Bittner 2016, Blondeel 2016, Kishishita 2015, Oguchi 2006, Sheikholeslami 2014].

#### **2.1.4. Bioreaktortypen**

Die Kultivierung der Organismen findet im Labormaßstab bis zirka 3 L in Schüttelkolben in kontrollierten Schüttelinkubatoren statt. Mit Hilfe unterschiedlicher Geometrien der Schüttelkolben und variierender Schüttelgeschwindigkeiten können Prozessparameter wie der spezifische Leistungseintrag, die Mischzeit, die maximale Fluidgeschwindigkeit und die Reynolds-Zahl beeinflusst werden. Hierdurch ist es möglich die spezifische Wachstumsrate der Organismen zu



verändern, um so eine Standardisierung und Vergleichbarkeit zwischen Laborstudien zu generieren [Platas 2013].

Die Organismen werden in Bioreaktoren überführt, um eine Maßstabsvergrößerung und Regelung spezifischer Prozessparameter zu realisieren. Sensoren für beispielsweise die Temperatur, den pH-Wert, Gelöstsauerstoff ( $pO_2$ ), Gelöstkohlenstoffdioxid ( $pCO_2$ ) als auch zusätzliche Prozessinformationen durch den Einsatz von beispielsweise Trübungs-, Raman- und Infrarotsonden können *in-situ* oder *ex-situ* integriert werden [Musmann 2016]. Die für eine optimale Kultivierung notwendigen Umgebungsparameter können mit Hilfe der regelbaren Prozessparameter in Bioreaktoren eingestellt werden.

Bioreaktoren für eine Suspensionskultur tierischer Zellen bestehen im Allgemeinen mindestens aus einem Behälter, der Mess- und Regelsysteme, Heiz- und Kühlschleifen, Gasein- und auslässe, Medienzuläufe, ein Probeentnahmesystem und ein Erntesystem besitzt. Hinzu kommt eine Vorrichtung, die die Zellsuspension agitiert. Neben Airlift-, Membran-, Festbett-, Wirbelschicht- oder wellengemischten Reaktoren werden gewöhnliche Rührkesselreaktoren (engl. stirred tank reactor, STR) für die Kultivierung eingesetzt [Al-Rubeai 2015, Birch 2006].

Der konventionelle Ansatz für die großvolumige Kultivierung tierischer Zellen ist die Implementierung von Rührkesselreaktoren mit einem Volumen zwischen 10.000 und 20.000 L [Marks 2003]. Ausgehend von Bioreaktoren für die mikrobielle Produktion, müssen für ein Scale-up von Bioreaktoren für tierische Kultivierungen individuelle Herausforderungen wie die Durchmischung und Begasung gelöst werden, die unterschiedliche Ansätze bezüglich des Equipments und Scale-ups benötigen [Marks 2003]. Diese Ansätze zielen auf eine Verbesserung der Produktivität, Robustheit und Bedienbarkeit dieser Systeme ab [Marks 2003].

## 2.2. Downstream Processing

Das Downstream Processing schließt sich der Kultivierung der Organismen in Bioreaktoren an und zielt auf eine rationale Abtrennung der Nebenkomponten. Nebenkomponten beeinflussen neben Prozessparametern wie dem pH-Wert oder Gelöstsauerstoff die kritischen Qualitätsattribute (engl. critical quality attributes, CQAs) von biopharmazeutischen Produkten. Zu diesen CQAs gehören die genaue Beschreibung der chemischen Zusammensetzung des Biopharmazeutikums inklusive der Aminosäuresequenz und aller posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen, die für eine korrekte Funktion dieser Proteine notwendig sind [Del Val 2010] ebenso wie Disulfidbrücken [Lamanna 2017]. Extrazelluläre Proteine wie Proteasen und Glycosidasen, die während der Kultivierung entstehen, beeinträchtigen negativ die Qualität von rekombinanten therapeutischen Proteinen, da sie Proteine strukturell verändern und deren Funktion beeinträchtigen [Chee Fung Wong 2005, Gao 2011, Gramer 1994, Park 2017, Robert 2009]. Die während der biotechnologischen Produktion von Biopharmazeutika entstehenden Nebenkomponten sind, wie in Tabelle 2 ersichtlich, komplex und umfassen Wirtszellproteine (engl. host cell proteins, HCPs), DNA (Desoxyribonukleinsäure), Viren, Zellen und Zellfragmente.

**Tabelle 2:** Physikochemische Eigenschaften der wichtigsten Klassen von Nebenkomponten, die während der Produktion von Biopharmazeutika entstehen können, nach [Singh 2016]. pI, isoelektrischer Punkt; MW, Molekulargewicht; HCPs, host cell proteins, Wirtszellproteine; DNA, Desoxyribonukleinsäure.

Klasse	pI	MW [kDa]	Hydrophobizität	Herkunft	Ursache
HCPs	2 - 11	10 - 200	Variabel	Wirtszellen	Sekretion, Lyse
DNA	2 - 3	90 - 1000	Gering	Wirtszellen	Lyse
Insulin	5,3 - 5,5	5,8	Gering	Medium	Feed
Viren	4 - 7,5	200 - 7200	Variabel	Wirtszellen, Medium	Kontamination
Endotoxine	1 - 4	3 - 40	Variabel	Medium, Kontamination	Kontamination

Die Verfahrensschritte zur effizienten Gewinnung und Reinigung von Biopharmazeutika innerhalb des DSP berücksichtigen physikochemische Eigenschaften der Haupt- und Nebenkomponten, wie Affinität, Ladung, Hydrophobizität und Molekulargewicht [Gronemeyer 2014, Kornecki 2017, Shukla 2007].

Der Schwerpunkt des hier betrachteten Integrationsansatzes sind HCPs, da diese Gruppe von Nebenkomponten aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften die größte Herausforderung für die Reinigung des Hauptprodukts darstellt [Singh 2016].

HCPs, die in mindestens einer physikochemischen Eigenschaft dem des Produkts entsprechen, sowie die potentielle nicht-kovalente Bindung von HCPs an Biopharmazeutika, werden im ungünstigsten Fall nicht abgetrennt. Letzteres erfordert einen weiteren Reinigungsschritt. HCPs, die durch die Verwendung unterschiedlicher Trennmethode nicht erfolgreich abgetrennt werden, sind ein Risiko für Patienten [Valente 2015, Wang 2009]. Aus diesem Grund muss mittels quantitativer Analyse sichergestellt werden, dass HCPs im Endprodukt definierte Grenzwerte nicht überschreiten [Wang 2009]. Im Fall der Grenzwertüberschreitung ist eine zielgerichtete Abreicherung der HCPs notwendig. Entsprechend der FDA existieren jedoch keine spezifischen Richtlinien für HCP Konzentrationen im Endprodukt [Graham 2015]. HCPs repräsentieren prozessbezogene Verunreinigungen, welche durch die Leitlinie Q6B der ICH (engl. International Council for Harmonisation, Internationaler Rat für Harmonisierung) [ICH Expert Working Group 1999] spezifiziert werden und durch die Leitlinie Q8 der ICH [ICH Expert Working Group 2009] als kritische Qualitätsattribute eingestuft werden und dementsprechend im DSP kontrolliert werden sollten [Graham 2015, ICH Expert Working Group 1999, ICH Expert Working Group 2009].

Im Vergleich zu der Zentrifugation und Protein A Affinitätschromatographie im Referenzprozess in Abbildung 1 gelten alternative Grundoperationen wie die wässrige Zweiphasenextraktion [Asenjo 2011, Azevedo 2009, Eggersgluess 2014, Rosa 2013, Schmidt 2017] oder die Kombination der Ionenaustausch- und hydrophoben Interaktionschromatographie als iCCC (engl. integrated counter current chromatography, integrierte Gegenstromchromatographie) [Zobel 2014] als kapazitive, integrierbare, effiziente und kostengünstige Verfahrensschritte. Eine Evaluierung der Trenneigenschaften bezogen auf den physikochemischen Eigenschaften der Nebenkomponten verbessert das Prozessverständnis [Kornecki 2017]. Durch dieses Verständnis ist es möglich kritische, immunogene Nebenkomponten zielgerichteter zu entfernen, was im Sinne des QbD-Konzepts zu einer verbesserten und konsistenten Produktqualität führt.

### **2.2.1. Wässrige Zweiphasenextraktion**

Die wässrige Zweiphasenextraktion (engl. aqueous two-phase extraction, ATPE) kann je nach Zusammensetzung der phasenbildenden Komponenten als Zellernte- oder Capture-Verfahrensschritt angewendet werden [Asenjo 2011, Azevedo 2009, Eggersgluess 2014, Gronemeyer 2016b, Schmidt 2017]. Wird die ATPE als Zellernteverfahren angewendet, akkumulieren die Zellen

zwischen der leichten und schweren Phase als Interphase [Schmidt 2017]. Hierbei besteht die Möglichkeit diese mit Hilfe von geeigneten Methoden von der produkttragenden Phase abzutrennen. Die für eine ATPE verwendeten Systeme (engl. aqueous two-phase systems, ATPS) bestehen beispielsweise aus diversen Kombinationen von Salzlösungen (Phosphat, Citrat) und Polymerlösungen (Polyethylenglykol, Dextran) oder Polymer-Polymerlösungen [Andrews 2005, Asenjo 2011, Dimer 2013, Johansson 1998, Merchuk 1998].

Die Wechselwirkungen der jeweiligen Polymerspezies sind unter sich vorteilhafter als die Wechselwirkungen zwischen den Polymeren. Bei Polyethylenglykol/Phosphat-Systemen befindet sich das Polyethylenglykol (PEG) überwiegend in der leichten Phase, während sich Phosphat in der schweren befindet. Zellen, Zellbruchstücke und weitere NebenkompONENTEN befinden sich nach einer kurzen Absetzphase aufgrund spezifischer Wechselwirkungen mit Systemkomponenten in der Interphase. Diese spezifischen Interaktionen basieren auf ionischen, hydrophoben sowie van-der-Waals-Wechselwirkungen. Diverse Prozessparameter wie Polymertyp, Molekulargewicht, Konzentration, Salztyp, pH-Wert, Ionenstärke und Eigenschaften des Zielproteins, wie Ladung, Molekulargewicht, Hydrophobizität, und die Interaktion untereinander beeinflussen den Vorgang. Der hohe Wasseranteil während der ATPE erlaubt eine schonende Extraktion mit dem Erhalt der biologischen Aktivität der Proteine [Asenjo 2011].

Die wässrige Zweiphasenextraktion besitzt eine hohe Selektivität, Biokompatibilität sowie ein einfaches Scale-up gegenüber der Zentrifugation [Albertsson 1961, Flatman 2007, Rosa 2009, Rosa 2010].

### **2.2.2. Säulenchromatographische Trennverfahren**

Säulenchromatographische Trennverfahren nutzen den Effekt, dass verschiedene Komponenten einer Lösung beim Durchströmen eines Festbetts einer Säule mit der Oberfläche der Feststoffpartikel verschiedenartig interagieren. Die daraus resultierenden, unterschiedlichen Verweilzeiten führen zu einer Komponententrennung. Chemische Oberflächeneigenschaften der Feststoffpartikel (stationäre Phase) bestimmen mit dem durchströmenden Fluid (mobile Phase) das spezifische Trennverfahren. Die unterschiedliche Interaktion mit den entsprechenden aktiven Gruppen der Feststoffoberflächen basiert auf den physikochemischen Eigenschaften der zu trennenden Komponenten. Bei geeigneter Wahl der mobilen und stationären Phase zeichnen sich die chromatographischen Verfahren durch eine schonende Trennung aufgrund niedriger Scherkräfte, gepufferter Lösungen und hoher Selektivität aus [Collins 2006, Dünnebieer 1998, Flatman 2007, Kelley 2009, Liu 2010, Schulte 2000, Shukla 2010, Strube 1998, Strube 2000].

---

Eine isokratische Trennung kann für niedermolekulare Substanzen ausreichen, da sie sich häufig hinreichend in ihren Wechselwirkungen unterscheiden. Proteinlösungen hingegen werden aufgrund ihrer komplexeren physikochemischen Eigenschaftsverteilung üblicherweise durch graduelle Veränderungen des pH-Werts oder der Salzkonzentration voneinander getrennt, bei dem zunächst schwach bindende Komponenten beginnen zu eluieren [Fekete 2015].

Die nachfolgend dargestellten Trennprinzipien von säulenchromatographischen Methoden sind grundsätzlich zur Reinigung auf die meisten Proteine anwendbar. Die Mehrzahl basiert auf einer spezifischen Interaktion der Proteine mit der stationären Phase, von der diese mit variablen Komponenten in der Zusammensetzung des Elutionspuffers, meist in Form von stufenartigen oder linearen Konzentrationsgradienten, wieder entfernt werden. Die Trennleistung wird gewöhnlich anhand des Zusammenspiels der Leistungsparameter Auflösung, Geschwindigkeit, Kapazität und Rückgewinnung evaluiert [GE Healthcare 2010].

### *Affinitätschromatographie (AC)*

Die Affinitätschromatographie ist oftmals der erste Verfahrensschritt in der Proteinaufreinigung, wenn eine immunspezifische Interaktion vorhanden ist [Huse 2002, Waugh 2005]. Die Affinitätschromatographie trennt Proteine auf Grundlage einer reversiblen Interaktion zwischen dem Analyten und einem spezifischen Liganden, welcher an eine stationäre Matrix gebunden ist. Der Ligand Protein A beispielsweise ist ein 42 kDa großes Zellwandprotein, welches dem Bakterium *Staphylococcus aureus* entstammt [Ayyar 2012]. Als gruppenspezifischer Ligand (spezifisch für eine Gruppe strukturell oder funktionell ähnlicher Substanzen) ist ein Molekül des Proteins in der Lage gleichzeitig zwei Moleküle IgG zu binden [Diamandis 1996]. Die hohe Affinität von Protein A für die konstante Fc-Region des IgG bei einem pH-Wert von 8,2 bildet die Grundlage für dieses Verfahren [Ayyar 2012, Huse 2002]. Aufgrund hoher Bindungskräfte sind häufig drastische Desorptionsbedingungen erforderlich, wodurch es zu einer Denaturierung des zu bindenden Proteins kommen kann [Ayyar 2012, Huse 2002]. Die Matrix der stationären Phase muss ein inertes Verhalten gegenüber den Proteinmolekülen und eine für die Bindung des Zielproteins ausreichende Kapazität an Liganden besitzen. Stationäre Matrices für die Protein A Affinitätschromatographie sind beispielsweise natürliche Agarose oder Cellulose als auch synthetische Polyvinylether (PVE), Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Poly(styrol-co-divinylbenzol) [Ramos-de-la-Peña 2019].

Eine Elution des gebundenen IgG erfolgt beispielsweise durch pH-Wert-Erniedrigung des Puffers, mit einem pH-Wert zwischen 2,5 und 3,0 [Ayyar 2012, Wink 2011]. Diese pH-Wert Erniedrigung kann zudem als Virusinaktivierungsschritt eingesetzt werden [Ejima 2007, Liu 2010].

Ausgelaugtes Protein A und nichtspezifisch bindende NebenkompONENTEN wie HCPs und DNA sind zu lösende Herausforderungen während dieses Prozessschrittes [Ramos-de-la-Peña 2019]. Ausgelaugtes Protein A reduziert die Kapazität der stationären Phase [Ramos-de-la-Peña 2019]. Des Weiteren umfassen die Nachteile hohe Herstellungskosten, Instabilität und Ablösen der Liganden, Lagerung und Herausforderungen während den Sterilisationszyklen [Ayyar 2012].

Aufgrund der spezifischen Bindung zwischen dem Ligand Protein A und dem Fc-Bereich des Antikörpers wird dieser Verfahrensschritt gewöhnlich als Capture-Schritt eingesetzt, bei dem eine Ausbeute von mehr als 95 % und eine Reinheit von mehr als 95 % erreicht werden können [Natarajan 2013, Sommerfeld 2005, Tarrant 2012]. Hohe Volumenströme der mobilen Phase, hohe dynamische Bindungskapazitäten der stationären Phase ( $> 65 \text{ g}_{\text{Antikörper}} \text{ L}_{\text{Adsorbens}}^{-1}$ , [Tosoh Bioscience LLC 2019]) und eine hohe Selektivität sind die wesentlichen Vorteile der (Protein A) Affinitätschromatographie [Ayyar 2012, Liu 2010].

### *Ionenaustauschchromatographie (IEX)*

Die Kombination diverser Verfahrensschritte im DSP basiert auf der jeweiligen Trennaufgabe und den physikochemischen Eigenschaften der Haupt- und NebenkompONENTEN [Kornecki 2017]. Zusätzlich zu einer affinitätsbasierten Reinigung können die Oberflächenladungen der Proteine, Peptide, Nukleinsäuren oder anderer geladener Biomoleküle genutzt werden [Fekete 2015]. Die Ionenaustauschchromatographie (engl. ion exchange chromatography, IEX) ermöglicht die Trennung geladener Moleküle.

Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch eine kontinuierliche Erhöhung der Salzkonzentration der mobilen Phase, woraus eine unspezifische Verdrängung der Ionen resultiert [Ishihara 2005, Yamamoto 1983]. Eine weitere Möglichkeit der Elution ist die Änderung des pH-Werts der mobilen Phase, wodurch die Nettoladung der Proteine verändert wird [Ahamed 2007]. Die desorptive Wirkung beruht auf zwei Effekten: Zum einen verdrängen die Ionen des Salzes die geladenen Amino-Seitenketten als Gegenion an der stationären Phase (Ionenaustauscheffekt). Zum anderen schwächt die steigende Ionenstärke die zur Bindung notwendigen elektrostatischen Wechselwirkung (Aussalzen).

Es wird zwischen Kationen- (CEX) beziehungsweise sauren und Anionenaustauschern (AEX) beziehungsweise basischen und schwachen sowie starken Ionenaustauschern unterschieden. Die stationären Phasen von schwachen Kationenaustauschern enthalten Carbonat-Ionen ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), starke hingegen Sulfat-Ionen ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Die Matrices von schwachen Anionenaustauschern beinhalten quartäre Ammoniumgruppen ( $\text{NR}_4^+$ , R: Rest), wohingegen starke Anionenaustauscher  $\text{NH}_4^+$ -Gruppen beinhalten [Wink 2011].

Die Ionenaustauschchromatographie wird für die Herstellung monoklonaler Antikörper gewöhnlich als Grundoperation nach dem Capture-Schritt eingesetzt [Sommerfeld 2005]. Das Zielprodukt wird während dieses Prozessschritts weiter aufgereinigt und konzentriert [Liu 2010, Sommerfeld 2005]. Eine Kombination von Anionen- und Kationenaustauscher kann gezielt die unterschiedlichen Oberflächenladungen der Nebenkompenten (siehe Tabelle 2) ausnutzen, um diese von dem Zielprodukt zu entfernen [Fekete 2015, Liu 2010, Shukla 2007].

#### *Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)*

Die Hydrophobizität der abzutrennenden Komponenten ist eine weitere physikochemische Moleküleigenschaft, die im DSP genutzt werden kann (siehe Tabelle 2). Die hydrophobe Interaktionschromatographie (engl. hydrophobic interaction chromatography, HIC) ist ein Gegenstück zu anderen Verfahren, welche Partikel aufgrund ihrer Ladung oder Größe trennen und wird im Herstellungsverfahren für monoklonale Antikörper als polishing-Schritt eingesetzt [Cramer 2011, Shukla 2010, Sommerfeld 2005].

Die Trennung der Komponenten erfolgt aufgrund ihrer relativen Hydrophobizität. Die dreidimensionale Struktur der Proteine besitzt hydrophobe Oberflächenregionen (aliphatisch oder aromatisch), die dem umgebenden Milieu exponiert sind. Proteine besitzen Anteile an hydrophilen und hydrophoben Oberflächenstrukturen, durch welche bei entsprechend geeigneter Ionenstärke, Temperatur und pH-Wert die Struktur und Löslichkeit beeinflusst wird und letztlich auch die Interaktion mit anderen hydrophoben Oberflächen, wie der stationären Phase der HIC [Mahn 2012, Wink 2011]. Materialien mit einer geringen Hydrophobizität, wie zum Beispiel kovalent an Matrix gebundene Butylreste, werden bevorzugt für stark hydrophobe Proteine eingesetzt. Materialien mit einer hohen Hydrophobizität, wie zum Beispiel Phenylreste, können für hydrophilere Proteine genutzt werden. Stationäre Phasen mit Octylresten sind hinsichtlich ihrer Hydrophobizität zwischen Butyl- und Phenylresten einzuordnen und daher für die meisten Proteine geeignet [Chen 2008, Mahn 2012, Wink 2011].



Die Elution erfolgt mit einem abnehmenden Gradienten bezüglich der Salzkonzentration oder der Zugabe von organischen Modifikatoren [Ghose 2013].

### *Größenausschlusschromatographie (SEC)*

Die analytische Proteintrennung während der Größenausschlusschromatographie (engl. size exclusion chromatography, SEC) erfolgt lediglich durch die Klassierung der Analyten nach ihrem hydrodynamischen Radius, sodass die Pufferzusammensetzung keinen direkten Einfluss auf die Auflösung besitzt [Böldicke 2018, Britsch 2003, Hong 2012]. Die SEC wird als Qualitätskontrolle des zu produzierenden Antikörpers eingesetzt, um die Produktfraktionen im Verlauf des Prozesses hinsichtlich hoch- und niedermolekularer Verunreinigungen als auch Produktaggregate zu charakterisieren [Böldicke 2018].

Die stationäre Phase besteht aus mikroporösen Partikeln (zum Beispiel quervernetzte Dextrane, Agarose oder Polyacrylamid [Hong 2012]), deren Porendurchmesser bestimmt, welche Moleküle die Poren via Diffusion penetrieren können und damit gegenüber den ausgeschlossenen Molekülen eine verlängerte Verweilzeit im durchströmten Festbett besitzen. Entscheidend für die Trennung ist der Stokesradius und die Porengröße der mikroporösen Partikel der stationären Matrix. Bei einer identischen, kugelförmigen Struktur von Proteinen in einer Mischung, ist die Reihenfolge der Elution umgekehrt proportional zum Molekulargewicht [Böldicke 2018].



### 2.3. Quality-by-Design

Quality-by-Design (QbD) ist ein systematischer Ansatz der Prozessentwicklung, der mit einer vordefinierten Zielsetzung beginnt und basierend auf wissenschaftlichen Daten und eines Qualitäts- und Risikomanagement den Schwerpunkt auf Produkt- und Prozessverständnis sowie Prozesskontrolle legt [ICH Expert Working Group 2009, Moore 2012]. Die Qualitätssicherung wird durch das Einhalten von GMP (engl. Good Manufacturing Practice, Gute Herstellungspraxis) erreicht und ist im industriellen Umfeld etabliert [Sikora 2015, Uhlenbrock 2017].

Die FDA, EMA, ICH und einige industrielle Arbeitsgruppen haben zudem Initiativen gestartet und eine Reihe an Leitfäden veröffentlicht, um unter anderem die Einführung der kontinuierlichen Arzneimittelherstellung zu fördern. Das prominenteste Beispiel ist der QbD-assozierte Leitfaden Q8 der ICH [ICH Expert Working Group 2009].

Die Herstellung von Biopharmazeutika in regulierten Industrien basiert jedoch fast ausschließlich auf absatzweisen Prozessen, obwohl kontinuierliche Prozesse entscheidende Vorteile in Bezug auf die Agilität, Flexibilität, Qualität, Kosten und einen gesellschaftlichen Nutzen bieten [Woodcock 2014]. Für diese Kategorien geben die FDA und CDER (engl. Center for Drug Evaluation and Research, Zentrum für Arzneimittelbewertung und -Forschung) konkrete Beispiele für erreichbare Verbesserungen an. Die kontinuierliche Herstellung (engl. continuous bioprocessing, CBP) von Biopharmazeutika ermöglicht den Ausbau von Produktionsmengen ohne die aktuellen Probleme, die mit Batch-Skalierungen (Agilität) einhergehen. CBP stellt sich auch der Herausforderung, die Produktion im Falle von Engpässen oder Notfällen rasch zu steigern (Flexibilität). Derzeit sind die Produktionslieferketten weltweit verbreitet und daher auf diverse Wegen anfällig. Darüber hinaus ermöglicht CBP regionale und intranationale Fertigungslösungen (Geographie). Die Umstellung auf CBP befähigt zudem die Einführung aussagekräftiger, statistischer Prozesskontrollen (Qualität) und eine geringere Anfangsinvestition (Kosten). Die Umweltauswirkungen von CBP sind in der Regel geringer. Die Nachfrage nach hochqualifiziertem Personal steigt und freiwerdende Ressourcen können in neue Produkte investiert werden (gesellschaftliche Vorteile) [Chanda 2015, Konstantinov 2015, Woodcock 2014].

Der generelle Ablauf einer Prozessentwicklung umfasst die Segmente

- Prozessentwicklung und historische Daten,
- Identifikation kritischer Qualitätsattribute (engl. critical quality attributes, CQAs),
- Risikoanalyse (FMEA, engl. Failure Mode and Effects Analysis, Auswirkungsanalyse)
- kleinskalige Modelle und

- Prozesscharakterisierung [Kornecki 2018a, Uhlenbrock 2017].

Die Identifikation und Bestimmung der CQAs ist Teil der QbD-basierten Prozessentwicklung. Das Ziel ist die Bestimmung von Qualitätsprofilen des Zielprodukts (engl. quality target product profile, QTTPs), welche die CQAs des Produkts definieren.

Ein geeigneter, multidimensionaler Betriebsbereich (engl. design space) in dem nachgewiesen worden ist, dass der Prozess Produkte mit zuvor definierter, ausreichender Qualität liefert, kann mit Hilfe der Einführung einer durch Prozessmodellierung und statistischer Versuchsplanung unterstützten Risikoanalyse entwickelt werden [Hakemeyer 2016, Uhlenbrock 2017, Zobel-Roos 2019]. Eine Veränderung der Parameter innerhalb des zugelassenen Design Space zählt nicht als Veränderung des Prozesses, welcher Nachkontrollen des Produktes oder des Prozesses benötigen würde [ICH Expert Working Group 2009].

Durch diesen Vorgang werden die Einflüsse der kritischen Prozessparameter (engl. critical process parameters, CPPs) auf die Qualitätsattribute beschrieben und überwacht. Die Produktqualität kann somit durch geeignete Kontrollstrategien, die diese Einflüsse betrachten, erhalten oder verbessert werden. Die Kontrollstrategien können des Weiteren durch PAT-Konzepte intensiviert werden [Strube 2018]. Die Hauptziele der PAT-Konzepte sind die Messung, Analyse, Beobachtung und letztendlich Kontrolle aller wichtigen (kritischen) Prozessattribute, die Einflüsse auf Prozessvariablen wie die Produktqualität besitzen [FDA 2004, Hinz 2006, Krull 2012, Sommeregger 2017, Wechselberger 2010, Winckler 2014].

Die Identifikation der CQAs ist ein essentieller Schritt in der Entwicklung von Biopharmazeutika. Dieser Schritt basiert auf einem umfassenden Verständnis des Einflusses der Produktqualität auf die Patientensicherheit und Wirksamkeit des Produkts [Alt 2016]. Produktspezifische CQAs von monoklonalen Antikörpern umfassen

- Größenvarianten (zum Beispiel hochmolekulare Spezies),
- Ladungsvarianten (zum Beispiel Desaminierung),
- Oxidationsvarianten (zum Beispiel Oxidationen von Aminosäuren),
- Glykosylierungen (zum Beispiel Defucosylierung) und
- Strukturvarianten (zum Beispiel Sequenzvarianten) [Alt 2016, Bechmann 2015, Brunner 2016, Horvath 2010, Khawli 2010, Kontoravdi 2007].

Des Weiteren zählen prozessbezogene Verunreinigungen, Rohmaterialien und auslaugbare Komponenten als auch obligatorische CQAs (zum Beispiel die äußere Erscheinung des

Arzneimittels) zu den zu kontrollierenden Qualitätsattributen [Alt 2016, Bracewell 2015, Goey 2018, Jin 2010, Tait 2012, Wang 2009]. Tabelle 3 zeigt mehrere analytische Ansätze um produktspezifische CQAs zu charakterisieren.

**Tabelle 3:** Produktspezifische CQAs von monoklonalen Antikörpern und ausgewählte analytische Methoden für deren Charakterisierung. MALS, multiangle light scattering; 2D-GE, zweidimensionale Gelelektrophorese; MS, Massenspektrometrie; cIEF, kapillare isoelektrische Fokussierung; HILIC, hydrophile Interaktionschromatographie; RP-HPLC, Umkehrphasenchromatographie; CD, Circular dichroismus; FTIR, Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie.

CQA	Analytische Methode	Referenz
Größenvarianten	SEC, MALS, 2D-GE, MS	[Christner 2014, Patel 2018]
Ladungsvarianten	IEX, cIEF, MS	[Khawli 2010, Kishishita 2015]
Oxidationsvarianten	MS	[Liu 2013, Wang 2016]
Glykosylierungen	HILIC, MS, RP-HPLC	[Chee Fung Wong 2005, Del Val 2010, Wang 2016]
Strukturvarianten	CD, FTIR, Fluoreszenz	[Kong 2007, Stanfield 2014]

Je nach betrachtetem CQA besitzen die analytischen Methoden spezifische Vor- und Nachteile. Im Allgemeinen werden Analysen präferiert, die im Rahmen der PAT-Initiative (siehe 2.4 Process Analytical Technology) für eine Online-Kontrolle eingesetzt werden können und reproduzierbar sowie effizient eindeutige Ergebnisse liefert [Chanda 2015, Hinz 2006].

## 2.4. Process Analytical Technology

Der stetige Bedarf an Prozessrobustheit und -verständnis führte durch die US-amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. Food and Drug Administration, FDA) im Jahr 2004 zu der Einführung der PAT-Initiative in der biotechnologischen, biopharmazeutischen und Lebensmittelindustrie [Biechele 2015, FDA 2004, Hinz 2006, Konakovsky 2016]. Diese Initiative dient der Messung, Analyse, Überwachung und letztendlich der Kontrolle aller essentiellen Attribute eines Herstellungsprozesses [Bechmann 2015, Ehgartner 2017, Gustavsson 2015, Hinz 2006, Liu 2017, Musmann 2016, Wechselberger 2010, Zobel-Roos 2017]. Das übergeordnete Ziel ist die Kontrolle kritischer Prozessparameter (CPP, engl. critical process parameters), die beispielsweise die zelluläre Wachstumsrate  $\mu$ , Produktionsraten des Produkts, der Wirtszellproteine und Metabolite ( $q_{\text{Produkt}}$ ,  $q_{\text{HCP}}$ ,  $q_{\text{Lactat}}$ ,  $q_{\text{Ammonium}}$ ) als auch die Produktqualität (zum Beispiel Proteinstruktur, posttranslationale Modifikationen und Wirksamkeit) beeinflussen [Alt 2016, Del Val 2010, Sagmeister 2013]. Dementsprechend ist eine Echtzeitanalyse der Bioreaktoren für einen effizienten, kontrollierbaren und robusten Prozess entscheidend. Die hierfür benötigten Sensorsysteme werden entsprechend des Analyseorts in *in-situ* (invasiv, nicht invasiv, in einem externen Probenkreislauf) oder in *ex-situ* klassifiziert [Lourenço 2012].

Abhängig vom Sensortyp und Messgröße können zwischen physikalischen, chemischen und biologischen Variablen unterschieden werden. Physikalische, chemische und biologische Variablen, deren Sensorsysteme sowie deren Fähigkeit, diese zur Onlinekontrollstrategie anzuwenden, sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Physikalische, chemische und biologische Variablen und deren korrespondierendes Sensorsystem. Die Fähigkeit diese zur Onlinekontrollstrategie zu verwenden, basiert auf: -, keine; +, nicht direkt anwendbar (nur in Kombination mit Prozessmodellen, Chemometrie, etc.); -/+, abhängig von der untersuchten Variablen; ++, direkt anwendbar.

Status	Variable	Sensortechnik	Online-Kontrolle	Referenz
Physikalisch	Temperatur	Thermoelement	++	[Chandra 2010, I.-A. Nisipeanu 2011]
	Schaum	Widerstand	++	[Teixeira 2009]
	Viskosität	Viskosimeter	+	[Schelden 2017]
	Druck	Manometer	++	[Konstantinov 2015]
	Rührrate	Drehzahlmesser	++	[Chandra 2010]
	Volumen-/ Massenfluss	Massenflussmesser	++	[Konstantinov 2015]
	Permittivität	Elektrochemische Sonde	++	[Kroll 2017b]
Chemisch	Gelöstsauerstoff	Clark oder optische Sonde	++	[I.-A. Nisipeanu 2011]
	Gelöstkohlenstoff- dioxid	Severinghaus- Elektrode	++	[Winckler 2014]
	Substrate/ Metabolite	Biosensor, HPLC, Spektroskopie	-/+	[Chee Fung Wong 2005, Musmann 2016, Weichert 2013]
	pH	pH Sonde	++	[Chandra 2010, I.-A. Nisipeanu 2011]
Biologisch	Biomasse/ Zellzahlkonz.	Mikroskop, Spektroskopie, Impedanz, Trübung	+	[Kornecki 2018b, Musmann 2016, Teixeira 2009]
	Zellmorphologie	Mikroskop, Durch- flusszytometer	-/+	[Bluma 2010]
	Zellmetabolismus	Fluoreszenz	-/+	[Ettinger 2014, Musmann 2016]
	Viabilität	Spektroskopie	+	[Musmann 2016]

Tabelle 4 zeigt den Nutzen von *ex-situ* und *in-situ* Spektroskopie, die für eine quantitative Beschreibung von Prozessvariablen angewendet werden. Spektroskopische Methoden werden auf Grund ihrer schnellen, sensitiven und verlässlichen Charakteristika vermehrt eingesetzt. Beispielhafte Methoden sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** Beispielhafter Überblick über spektroskopische Methoden, die Prozessvariablen von tierischen Zellkulturen quantitativ messen können nach Musmann [2016]. UV/Vis, ultraviolettes und sichtbares Licht; MIR, NIR, mittlere beziehungsweise nahe Infrarotspektroskopie.

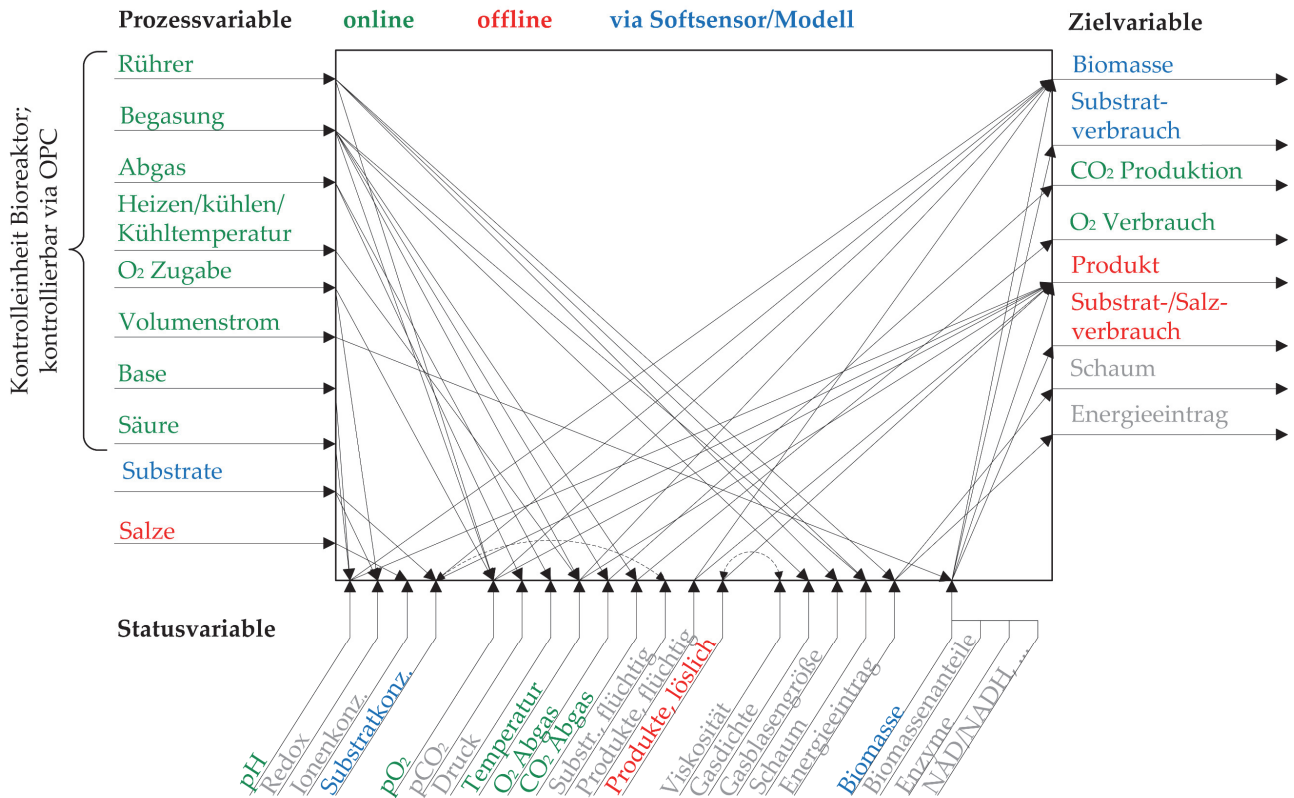
Methode	Prozessvariable
UV/Vis	Totale Zellzahlkonzentration
Fluoreszenz	Viable Zellzahlkonzentration, Produkt, Tyrosin, Tryptophan
Raman	Glucose, Lactat, Glutamin, Glutamat, Ammonium, Viable Zellzahlkonzentration
NIR	Glucose, Lactat, Biomasse, Glutamat, Ammonium, Produkt
MIR	Glucose, Ethanol, organische Säuren

Spektroskopische Methoden messen online den zellulären Zustand, die Substrat-, Produkt- sowie Metabolitkonzentrationen. Die gewöhnliche Messung dieser Prozessvariablen mittels dedizierter Messgeräte (zum Beispiel Mikroskop oder Online Glucose-Analysator) ist entweder arbeitsintensiver, anfällig für Wartungsarbeiten oder ist nur fähig, eine spezifische Variable zu messen. Spektroskopische Sonden eliminieren diese Nachteile mit Hilfe von Multiplexverfahren, deren prozessunabhängigen, ökonomischen Einsatzes und deren simplen Prozessintegration [Arnold 2003, Berry 2015, Musmann 2016, Rhie 2002]. Die Analyse und Interpretation der Spektraldaten kann komplex sein, und eine Korrelation zwischen Antwort und Faktoren ist nicht immer offensichtlich [Teixeira 2009].

Die komplexen Spektraldaten der beispielweisen Raman, NIR, MIR und Fluoreszenzspektroskopie müssen aus diesem Grund mit Hilfe von multivariater Datenanalyse (Chemometrie) analysiert werden. Die Chemometrie umfasst mathematische und statistische Methoden, um optimale Messprinzipien zu designen und auszuwählen sowie die Analyse chemischer Daten für einen maximalen Informationsgewinn [Otto 2017]. Techniken wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. Principal Components Analysis), Hauptkomponentenregression (PCR, engl. Principal Components Regression) und der Regression der partiellen kleinsten Quadrate (PLS, engl. Partial Least Squares Regression) werden aufgrund der nicht selektiven, spektroskopischen Messungen und der hohen Kollinearität der Variablen verwendet, um Korrelationen zwischen Spektraldaten und beispielsweise Prozessvariablen zu identifizieren und quantifizieren [Faassen 2015, Lourenço 2012, Musmann 2016, Otto 2017].

Die hohe Auflösung während der Datenaufnahme der Zielvariablen wie der Zellzahl- oder Glucosekonzentration ist essentiell für die Prozesskontrolle und erhöht das Prozessverständnis

aufgrund der Korrelation zwischen Prozessparametern, Statusvariablen und Zielvariablen. Die Möglichkeit, diese Variablen in dem betrachteten System online, offline sowie via Software-basierter Sensoren oder Prozessmodelle zu quantifizieren ist in der nachfolgenden Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Korrelationen zwischen Prozess-, Status- und Zielvariablen. In dem betrachteten System sind Variablen online (grün), offline (rot) und via Software-basierten Sensoren und Prozessmodellen (blau) online mess- und kontrollierbar, nach Kornecki [2018b] und Präve [1994].

Prozessparameter wie die Rührrate, Begasung oder Basenzugabe werden mit Hilfe dedizierter Kontrolleinheiten (DCU, engl. digital control unit) oder mittels OPC-Plattformen (engl. open platform communication) aufgenommen und kontrolliert. Variablen, welche *in-situ* nicht direkt messbar sind, werden mit Hilfe der hier etablierten spektroskopischen Methoden mittels geeigneter Strategien mess- und kontrollierbar.

Kommerziell erhältliche *in-situ* Trübungssonden, die die optische Dichte (OD) der Suspension messen, können für die Messung der Zellzahlkonzentration eingesetzt werden [Biechele 2015, Kroll 2017b]. Trübungsmessungen werden mittels Transmission, Absorption, Reflektion oder Streuung durchgeführt [Biechele 2015, Hausmann 2017]. Die signifikantesten Vorteile von Trübungssonden sind die hohe Auflösung sowie deren simple Nutzung und Implementierung. Die OD kann jedoch je nach zellulärem Zustand (zum Beispiel Zellviabilität und Zellwachstumsphase) variieren, sodass eine Diskrepanz zwischen der physikalischen Trübung der Suspension und der

Zellzahlkonzentration entstehen kann. Trotz dieses Nachteils messen Trübungssonden die OD online und können dementsprechend für Kontrollstrategien (zum Beispiel kontinuierliche Turbidostat Kultivierungen) eingesetzt werden, sofern die oben erwähnte Diskrepanz nicht eintritt (oder diese berücksichtigt wird) [Kroll 2017b, Pörtner 2017].

Entsprechend den Q8 Richtlinien der ICH sind Techniken bevorzugt die zusätzliche Information über die Zellkultur (zum Beispiel Zellviabilität) liefern [ICH Expert Working Group 2009, Kroll 2017b]. Die Raman Spektroskopie in Kombination mit chemometrischen Analysemethoden kann für die Bestimmung der totalen oder viablen Zellzahl- sowie der Substrat- und Metabolitkonzentration genutzt werden [Esmonde-White 2017, Musmann 2016].

Eine mögliche Kombination von Trübungsmessungen und/oder Raman Spektroskopie mit einem makroskopisch kinetischen Model als Software-basierten Sensor ermöglicht eine quantitative *in-situ* Bestimmung von Prozessvariablen [Luttmann 2012].



## 2.5. Modellierung der Kultivierung von Säugetierzellen – Digitaler Zwilling

Die modellbasierte Prozessentwicklung wird in biotechnologischen Verfahren immer häufiger eingesetzt [Ben Yahia 2015, Carta 2010, Franke 2004, Kiparissides 2011, Kroll 2017a, Ladisch 2015, Nfor 2009, Strube 2007, Strube 2012, Thiess 2017b, Wiesel 2003, Zobel-Roos 2019]. Im Rahmen der QbD-basierten Prozessauslegung minimieren digitale Prozessmodelle (digitaler Zwilling, engl. digital twin) den experimentellen Aufwand, da sie Experimente im Versuchsplan ersetzen [Huter 2019, Schmidt 2019, Zobel-Roos 2019]. Des Weiteren können Prozessmodelle durch das Beschreiben der Effekte und Verhalten der realen Zwillinge prozessunterstützend verwendet werden [Kager 2018, Kornecki 2019, Stelzer 2017, Zobel-Roos 2018]. Für diese Anwendungen müssen die digitalen Zwillinge jedoch quantitativ validiert werden [Zobel-Roos 2019].

Makroskopische Prozessmodelle, die die dynamischen Zusammenhänge während der Kultivierung von Säugetierzellen in Suspension in Bioreaktoren quantitativ beschreiben, können für die Simulation, Optimierung und Prozesskontrolle eingesetzt werden [Xing 2010]. Limitierende Nährstoffe wie Glucose oder Glutamin und inhibierende Metabolite wie Lactat und Ammonium, die das zelluläre Wachstum und die Proteinproduktion beeinflussen, müssen mit Hilfe kinetischer Zusammenhänge quantitativ erfasst werden.

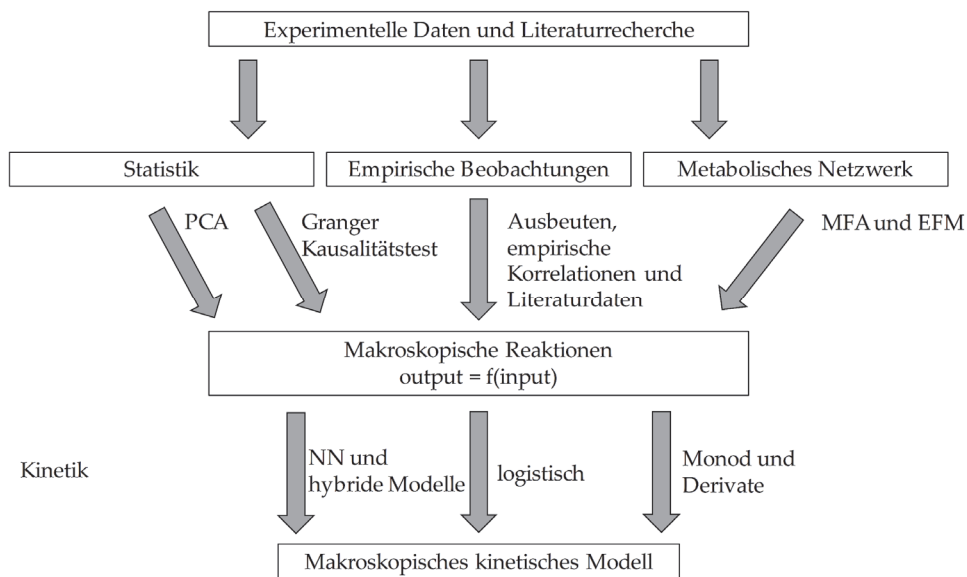
Makroskopische Modelle können für unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten verwendet werden [Ben Yahia 2015]:

- Zusammenfassung beziehungsweise Substitution einer Vielzahl von experimentellen Daten und Versuchen,
- Untersuchung von Konzepten und das Testen von Hypothesen,
- Voraussage des Systemverhaltens unter experimentell nicht untersuchten Bedingungen,
- Erkennung von optimalen Prozessbedingungen.

Je nach Betrachtung der zellpopulationskinetischen Darstellung, können Prozessmodelle biologischer Systeme in unstrukturiert, strukturiert sowie in unsegregiert und segregiert unterschieden werden [Chmiel 2011]. Eine unstrukturierte, unsegregierte Betrachtung stellt hierbei eine extreme Simplifikation dar, bei der intrazelluläre Prozesse vernachlässigt werden. Eine realitätsnahe Simulation kann durch ein strukturiertes, segregiertes Modell unter Berücksichtigung des Zellmetabolismus beschrieben werden [Pörtner 1996]. Während der Modellierung der Kultivierung muss deshalb das Gleichgewicht zwischen einer simplifizierten und detaillierten Betrachtungsweise des biologischen Systems evaluiert werden, um in der frühen

Prozessentwicklung schnelle und ausreichend präzise Beschreibungen des Zellverhaltens und der Produktbildung zu generieren.

In Abbildung 3 sind diverse Ansätze aufgeführt, um die dynamischen Vorgänge während der Kultivierung zu modellieren [Ben Yahia 2015]. Nach Ben Yahia [2015] können die Beziehungen zwischen Eingangs- (zum Beispiel Substratkonzentration) und Ausgangsvariablen (zum Beispiel Zellzahlkonzentration) makroskopisch mit Hilfe statistischer Methoden wie der Hauptkomponentenanalyse, empirischer Beobachtungen mittels Ausbeutekoeffizienten und metabolischer Netzwerke durch die Analyse des metabolischen Flux modelliert werden. Das darauf aufbauende kinetische Modell kann durch die Verwendung von neuronalen Netzwerken, logistischen oder Monod-basierten Ansätzen entwickelt werden. Ausgehend von experimentellen Daten und Literaturwerten, ist die Anwendung empirischer Beobachtungen für die Korrelation der Eingangs- und Ausgangsgrößen sowie ein Monod-basierter kinetischer Ansatz die direkteste Methode für die Implementierung eines makroskopisch kinetischen Prozessmodells für die Simulation der Zellkultivierung in Bioreaktoren.



**Abbildung 3:** Methoden für die Entwicklung makroskopischer kinetischer Modelle nach Ben Yahia [2015]. PCA, Hauptkomponentenanalyse; MFA, Analyse des metabolischen Flux; EFM, Verfahren des elementaren Flux; NN, neurale Netzwerke.

In Tabelle 6 sind ausgewählte Modellansätze zur Kultivierung tierischer Zellen aufgelistet. Die Mehrzahl der hier aufgeführten Modellansätze verwenden metabolische Netzwerke durch eine Kopplung der Analyse der intrazellulären metabolischen Flüsse mit extrazellulär gemessenen Modellvariablen. Der Detailgrad dieses Ansatzes ist höher als durch die Verwendung empirischer

Beobachtungen [Ben Yahia 2015, Dorka 2009, Martinez 2013], was zu einer aufwändigeren Erstellung des Modells führt und für eine schnelle Prozessentwicklung ungeeignet ist. Korrelationen für das zelluläre Wachstum, insbesondere der Wachstumsrate  $\mu$ , sind häufig der Monod-Kinetik abgeleitet, die Glucose, Glutamin oder beide Komponenten als limitierendes Substrat betrachten. Die Kinetik kann durch Terme erweitert werden, die diverse inhibierende Metabolite wie Lactat oder Ammonium berücksichtigen [Carlsson 2009, Pörtner 1996, Xing 2010].

Glucose oder Glutamin sind nicht immer die limitierenden Substrate, da sie jedoch experimentell effizienter gemessen werden können als andere Nährstoffe, basieren die kinetischen Modelle häufig auf diesen Medienkomponenten (Pörtner & Schäfer 1996).

**Tabelle 6:** Ausgewählte Modellansätze zur Modellierung der Kultivierung tierischer Zellen diverser Arbeitsgruppen. MFA, Metabolic Flux Analysis; EFM, Elementary Flux Mode; PFA, Principal Factor Analysis; FBA, Flux Balance Analysis.

Jahr	Organismus	Verfahrens- weise	Eingangs- Ausgangs- Korrelation	Modellvariablen oder betrachtete Stoffwechselwege	Referenz
2016	CHO	Batch	Genome-scale	>1,700 Gene	[Hefzi 2016]
2015	Hybridoma 130-8F	Batch	Dynamisches Modell	X, Glc, Gln, Asn, Asp, Lac, Pro, Ala, mAb, Glu, Amm	[Selișteanu 2015]
2014	CHO	Batch, Fed- Batch	MFA	Kopplung des Einzelzellmodells mit der extrazellulären Umgebung und dem Zellpopulationsverhalten	[Chen 2014]
2014	CHO	Batch	<sup>13</sup> C MFA	Glykolyse, TCA-Zyklus, Anaplerotische Reaktionen, Synthese von Fettsäuren, Proteinen und Kohlenhydraten, Aminosäurenstoffwechsel	[Nicolae 2014]
2014	CHO	Batch, Fed- Batch	Dynamische MFA	Glc, Lac, Pyr, Amm, Ala, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, Ser	[Wahrheit 2014]
2013	AGE1.HN	Batch	Emp. Beobachtung	X, Amm, Lac, Gln, mAb, Glc	[Borchers 2013]
2013	CHO-XL99	Batch	FBA + Ausbeutekoeff.	Glycolysis, TCA cycle, Pentosephosphatweg, Biomassevorläufer (z.B., Fettsäuren, Steroide, Glykogen und Nukleotide)	[Martinez 2013]
2013	CHO	Fed-Batch	<sup>13</sup> C MFA	Glycolysis, TCA cycle, Pentosephosphatweg, mehrere kata- und anaplerotische Reaktionen, Aminosäurenstoffwechsel	[Templeton 2013]
2011	CHO-K1	Fed-Batch	instationäre <sup>13</sup> C MFA	73 Reaktionen und 77 Metabolite	[Ahn 2011]
2011	CHO	Batch, Fed- Batch	MFA	30 Metabolite in 34 Bioreaktionen	[Naderi 2011]
2010	CHO	Fed-Batch	Emp. Beobachtung	X, Amm, Lac, Gln, mAb, Glc	[Xing 2010]
2009	CHO, BHK, Hybridoma	Batch, Fed- Batch	Nichtlineare Parameter- bestimmung	X, Amm, Lac, Gln, mAb, Glc	[Goudar 2009]
2008	CHO	Fed-Batch	PFA	X, Amm, Lac, Gln, Glc, CO <sub>2</sub> , mAb	[Xing 2008]
2007	Hybridoma 130-8F	Batch	MFA + EFM	X, Glc, Glu, Ala, Pro, CO <sub>2</sub> , Asp, Asn, Amm, Lac, Gln, Pro, mAb	[Gao 2007]
2007	Hybridoma 14-4-4S	Fed-Batch	Emp. Beobachtung	X, Amm, Lac, Gln, Glc, mAb, Glycosylierung	[Kontoravdi 2007]
2007	BHK-21A	Fed-Batch	Metabolisches Netzwerk + EFM	X, Ala, Amm, Lac, Gln, Glc, mAb	[Teixeira 2007]
2006	CHO	Batch	MFA	10 Reaktionen für Wachstums-, 4 Reaktionen für Übergangs- und 3 Reaktionen für Sterbephase	[Provost 2006]
2004	CHO	Batch	Neurales Netzwerk	X, Glc, Lac, Gln	[Vande Wouwer 2004]
2001	CHO TF 70R	Kontin.	MFA	48 Metabolite und 43 Reaktionen	[Altamirano 2001]
1999	CHO	Kontin.	MFA	33 Reaktionen	[Nyberg 1999]

Die Reaktionsrate  $R_X$ , die die zeitliche Änderung der viablen Zellzahlkonzentration  $X_V$  beschreibt, kann mit Hilfe der Wachstums- ( $\mu$ ) und Sterberate ( $\mu_d$ ) beschrieben werden [Xing 2010]. Die gewöhnliche Differentialgleichung ist in Gleichung (2.1) dargestellt.

$$R_X = \frac{dX_V}{dt} = (\mu - \mu_d) \cdot X_V \quad (2.1)$$

Die variable Wachstumsrate  $\mu$  (Gleichung (2.2)) ist entsprechend der Monod-Kinetik [Monod 1949] abhängig von Substrat-  $[S_i]$  und Metabolitkonzentrationen  $[M_i]$ .

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \prod \frac{[S_i]}{K_{S_i} + [S_i]} \cdot \prod \frac{K_{M_i}}{K_{M_i} + [M_i]} \quad (2.2)$$

Der Parameter  $\mu_{\max}$  beschreibt die maximale Wachstumsrate, die ein Organismus bezogen auf das spezifische Substrat besitzt. Der Parameter  $K_{S_i}$  beziehungsweise  $K_{M_i}$  ist die Affinitätskonstante für das jeweilige Substrat oder Metabolit.

Die Sterberate  $\mu_d$  hängt von der maximalen Sterberate  $k_d$ , Metabolitkonzentration  $[M_i]$  und der Halbsättigungskonstante  $K_{D_i}$  ab (Gleichung (2.3)).

$$\mu_d = k_d \cdot \prod \frac{[I_i]}{K_{D_i} + [I_i]} \quad (2.3)$$

Die zeitliche Änderung der Substrat- ( $R_S$ ) und Metabolitkonzentrationen ( $R_M$ ) wird wie  $R_X$  mittels gewöhnlicher Differentialgleichungen abgebildet (Gleichungen (2.4) und (2.5)).

$$-R_S = -\frac{dS_i}{dt} = R_X \cdot \frac{1}{Y_{X/S}} + m_{S_i} \cdot X_V = (\mu - \mu_d) \cdot X_V \cdot \frac{1}{Y_{X/S}} + m_{S_i} \cdot X_V \quad (2.4)$$

$$R_M = \frac{dM_i}{dt} = R_X \cdot \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot Y_{M/S} + m_{S_i} \cdot X_V \cdot Y_{M/S} \quad (2.5)$$

Die Ausbeutekoeffizienten  $Y_{X/S}$  beziehungsweise  $Y_{M/S}$  korrelieren, basierend auf experimentellen Daten, die Eingangs- zu den Ausgangsvariablen.  $Y_{X/S}$  und  $Y_{M/S}$  beziehen beispielsweise die gebildete Zellzahl  $X$  oder Menge Metabolit  $M$  zu dem verbrauchtem Substrat  $S$ , bezogen auf die jeweilige Wachstumsphase der Zellkultur (Anlauf-, exponentielle, stationäre und Sterbephase). Der Koeffizient  $m_{S_i}$  beschreibt die spezifische Rate der Substrataufnahme für die Erhaltungsaktivität der Organismen [Clarke 2013, Doran 2013].

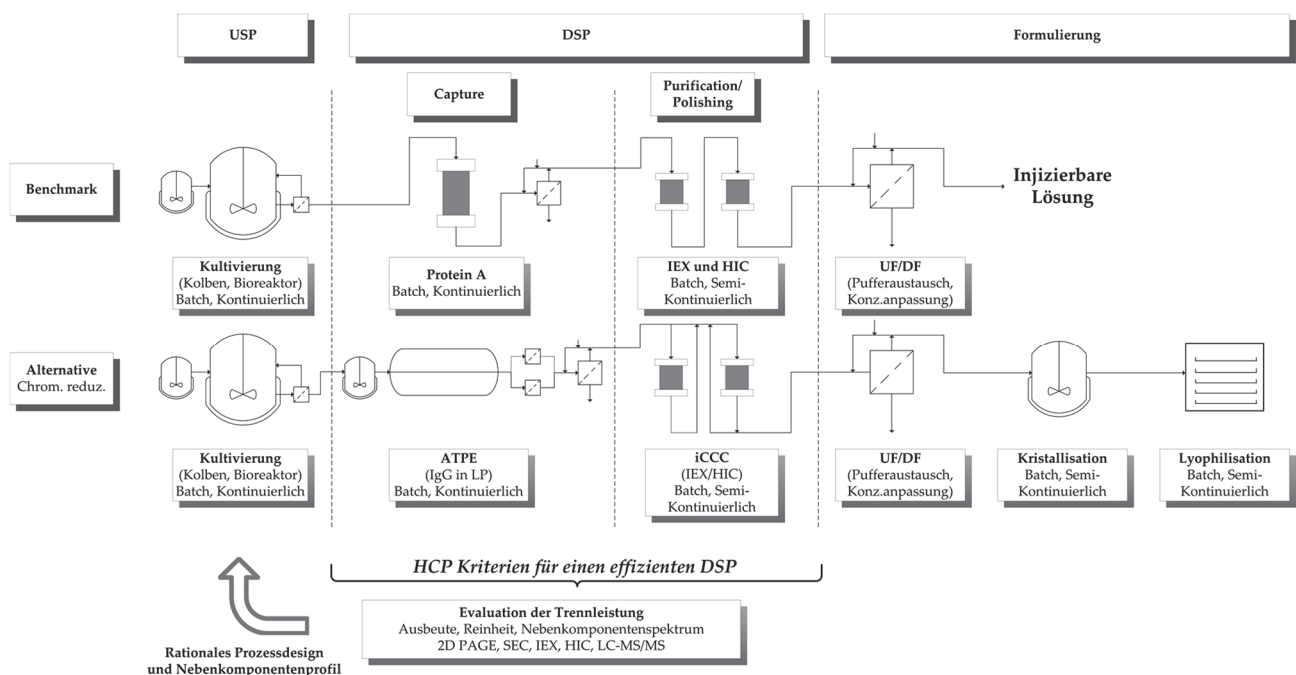
Die Produktionsrate  $R_P$  in Gleichung (2.6) wird durch eine zellspezifische Produktbildungsrate  $Q_P$  beschrieben.

$$R_P = \frac{d[P]}{dt} = Q_P \cdot X_V \quad (2.6)$$

Die Gleichungen (2.2) bis (2.5) können durch das weitere Einfügen von Substraten, Metaboliten und deren Modellparametern detailliertere Prozessmodelle liefern, die das zelluläre Wachstum exakter beschreiben können. Auf diese Weise kann ein einfaches Prozessmodell, welches zunächst für eine schnelle Prozessentwicklung generiert wurde, genutzt werden, um durch eine Erweiterung der Modellterme präzisere Prozessmodelle zu erhalten. Das Ziel der Modellierung der Kultivierung von Säugetierzellen ist jedoch ein metabolisches Netzwerk zu erstellen, welches basierend auf metabolischen Flüssen in der Lage ist komplexere Zusammenhänge darzustellen.

## 2.6. Konzept der USP-DSP-Integration

Der betrachtete alternative Herstellungsprozess für monoklonale Antikörper ist, auf die wesentlichen Verfahrensschritte reduziert, in Abbildung 4 (unten) zu erkennen. Der plattformbasierte Prozess in Abbildung 4 (oben) dient als Referenz.



**Abbildung 4:** Übersichtsdarstellung des betrachteten Prozesses inklusive des USP-DSP-Integrationsansatzes.

Die Integration des USP und DSP zielt auf eine globale Prozessoptimierung hinsichtlich der Abtrennung der Nebenkomponenten ab. Eine datengetriebene Klassifizierung und Quantifizierung der abzutrennenden Nebenkomponenten ist nötig, um die Trennleistung des DSP zu evaluieren. Mit Hilfe dieser Daten können die Nebenkomponenten in kritisch, weniger kritisch und unkritisch

klassifiziert werden. Wie in Abbildung 4 dargestellt, ist anschließend eine rückwärtsintegrierte Prozessoptimierung im USP möglich, um kritische, nicht vollständig abgetrennte Nebekomponenten zu reduzieren oder zu eliminieren. Zu den Prozessoptimierungen im USP zählen Verbesserungen hinsichtlich der Medienzusammensetzung (zum Beispiel Aminosäuren, Vitamine, Salze, etc.) und/oder der Prozessparameter (zum Beispiel Verfahrensweise, Temperatur, Gelöstsauerstoff, pH, etc.) [Agarabi 2015, Agarabi 2016, Bechmann 2015, Brunner 2016, Jain 2008, Reinhart 2015]. Online Kontrollstrategien, die essentielle Prozessvariablen messen, analysieren und überwachen, werden benötigt, um den Einfluss der rückwärtsintegrierten USP-DSP-Integration auf die Prozessvariablen zu quantifizieren. Eine anschließende Kontrolle der Variablen ermöglicht robuste Prozesse für die Herstellung von Biopharmazeutika [Hinz 2006, Mercier 2016].

Die Prozesskontrolle der Kultivierung in Bioreaktoren soll durch eine Kombination spektroskopischer Methoden mit einem makroskopischen kinetischen Modell realisiert werden. Hierdurch sollen online Kontrollstrategien für beispielsweise kontinuierliche Turbidostat Kultivierungen entwickelt werden. Zusätzlich sollen Substrat- und Metabolitkonzentrationen mit Hilfe dieser Kombination quantitativ bestimmt werden, die zuvor nur offline messbar waren. Das Prozessmodell soll zu einem tiefergehenden Prozessverständnis und dementsprechend zu einem robusteren Prozess führen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Angewandte Methoden der Zellkulturtechnik

##### *Organismen*

Zellen aus den Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*) wurden für alle Kultivierungen verwendet. Die verwendete Zelllinie CHO DG44 (engl. Chinese Hamster Ovary), die auf dem DHFR (Dihydrofolatreduktase) Amplifikationssystem beruht, exprimiert einen monoklonalen Antikörper der Klasse G Subtyp 1 (IgG1).

##### *Anlegen der Arbeitszellbank*

Das Anlegen der Arbeitszellbank wurde mit Hilfe einer Zellsuspension durchgeführt, deren Zellviabilität bei mindestens 90 % lag und sich in der exponentiellen Phase befand. Es wurden je  $3,5 \cdot 10^7$  viable Zellen in 1 mL Einfriermedium (92,5 % Stammhaltungsmedium mit 7,5 % Dimethylsulfoxid) in ein Kryovial (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Vereinigte Staaten) überführt. Das für die Kryokonservierung benötigte Kulturvolumen wurde in Zentrifugenbehälter überführt und bei  $180 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit Hilfe des Einfriermediums resuspendiert und anschließend in die Kryovials überführt und für mindestens 24 h bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff.

##### *Revitalisierung der Arbeitszellbank*

Die Revitalisierung der Arbeitszellbank wurde mit dem Auftauen eines Kryovials in einem Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  initiiert. Die Zellsuspension wurde in 10 mL vorgewärmtes Medium ( $36,8^\circ\text{C}$ , inklusive 15 nM Methotrexat) überführt und bei  $180 \times g$  für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Hilfe von 150 mL des auf  $36,8^\circ\text{C}$  vorgewärmten Stammhaltungsmediums (inklusive 15 nM Methotrexat) resuspendiert und in einen 500 mL Schüttelkolben (Corning Inc., Corning, NY, Vereinigte Staaten) überführt. Nach einer Stunde wurde die viable Zellzahl und Zellviabilität überprüft. Letztere sollte bei mindestens 90 % liegen.

##### *Kultivierungsparameter*

Die CHO DG44 Zelllinie wurde kontinuierlich als Stammhaltung in Schüttelkolben in serumfreien Stammhaltungsmedium (SMD, CellcaCHO Expression Platform, Sartorius Stedim Biotech GmbH,



Göttingen, Deutschland) umgesetzt. Die Passage der Zellen in frisches Medium erfolgte alle 3 bis 4 Tage mit einer Inokulumkonzentration von  $2,0 \cdot 10^5$  viablen Zellen mL<sup>-1</sup>. Die Kultivierungsparameter im Schüttelinkubator (Minitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) lagen bei 36,8 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 2,5 cm Hub und 130 rpm.

### 3.2. Methoden zu Versuchen des Upstream Processing

#### *Fed-Batch Kultivierung*

Der Fed-Batch Prozess besaß inklusive der Revitalisierung fünf Vorkulturen (n-5). Im Anschluss an die Vorkulturen wurde das Produktionsmedium (PM, CellcaCHO Expression Platform, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) des Produktionsbioreaktors (n) inokuliert. In Tabelle 7 ist der allgemeine Prozessablauf der Fed-Batch Kultivierung zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Zusammenfassung des allgemeinen Prozessablaufs der Fed-Batch Kultivierung. VZ, viable Zellzahlkonzentration; MTX, Methotrexat; PM, Produktionsmedium.

Prozessschritt	Revitalisierung n-5	n-4	n-3	n-2	n-1	Produktion n
Medium	SMD inklusive 15 nM MTX	SMD inklusive 15 nM MTX	SMD inklusive 15 nM MTX	SMD	SMD	PM
Inokulum [10 <sup>6</sup> VZ mL <sup>-1</sup> ]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
Passage	1	2	3	4	5	6
Laufzeit [d]	3	3 - 4	3 - 4	3 - 4	3	12
Tag des Prozesses [d]	0	3	6 - 7	9 - 11	12 - 15	15 - 18

Die Kultivierungsbedingungen waren bei allen Fed-Batch Prozessen identisch (36,8 °C, pH 7,1, 60 % pO<sub>2</sub>, 433 rpm und 150 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> Luft). Die Begasung erfolgte durch einen Ringgasverteiler unterhalb des Rührers und durch Kopfraumbegasung (10 %). Der 3-Blatt-Segmentimpeller besaß einen Durchmesser von 54 mm und einem Winkel der drei Blätter von jeweils 30° (bbi-biotech GmbH, Berlin, Deutschland). Die Vorkulturen (n-5 bis n-1) wurden in Schüttelkolben in einem Schüttelinkubator kultiviert. Der 2 L Glasbioreaktor (n) (Biostat® B, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) wurde von einer digitalen Kontrolleinheit (engl. digital control

unit, DCU, Biostat® B, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) gesteuert. Der pH-Wert wurde durch die zusätzliche Begasung von CO<sub>2</sub> und durch Zugabe einer 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung geregelt. Der Gelöstsauerstoff pO<sub>2</sub> wurde durch die zusätzliche Begasung von N<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> geregelt. Antischaummittel (20 g L<sup>-1</sup>, Antischaum C Emulsion, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Vereinigte Staaten) wurde, wenn nötig, hinzugegeben, jedoch nicht mehr als insgesamt 0,2 Vol.-% der Biosuspension.

Die Zufütterung der Medien FMA und FMB (CellcaCHO Expression Platform, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) wurden nach Herstellervorgaben nach 72 h Kultivierung täglich einmal hinzugegeben. Die tägliche Masse an FMA lag bei einer Dichte der Nährlösung von 1,0558 g mL<sup>-1</sup> bei 42 g<sub>FMA</sub> L<sub>Biosuspension</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Die tägliche Masse an FMB lag bei einer Dichte der Nährlösung von 1,0494 g mL<sup>-1</sup> bei 4,2 g<sub>FMA</sub> L<sub>Biosuspension</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Zusätzlich wurde eine 400 g L<sup>-1</sup> Glucoselösung hinzugegeben, sobald die Biosuspension eine Glucosekonzentration von kleiner als 5,0 g L<sup>-1</sup> besaß. Durch die Zugabe der konzentrierten Glucoselösung wurde eine Zielkonzentration an Glucose von 5,0 g L<sup>-1</sup> angestrebt.

#### *Kontinuierliche Kultivierung (Perfusion)*

Die Kultivierungsparameter können dem Fed-Batch Prozess entnommen werden. Das Volumen der Biosuspension während den kontinuierlichen Kultivierungen betrug 1 L. Die alternierende Tangentialflussfiltration (ATF) wurde für die Zellrückhaltung der Perfusion eingesetzt. Die Perfusion wurde initiiert sobald die viable Zellzahlkonzentration 2 · 10<sup>6</sup> Zellen mL<sup>-1</sup> erreicht hatte. Ein täglicher Volumenaustausch von 1 V<sub>Reaktor</sub> d<sup>-1</sup> wurde während allen kontinuierlichen Kultivierungen eingestellt. Die viable Zellzahlkonzentration wurde durch den Einsatz einer *in-situ* Trübungssonde (Transmission, 880 nm, HiTec Zang GmbH, Herzogenrath, Deutschland) konstant gehalten.

Die Kontrollstrategie mit Hilfe der *in-situ* Trübungssonde, Zufuhr-, Filtrat- und Bleedpumpe wurde mit Hilfe des LabManager® (HiTec Zang GmbH) realisiert. Sobald die optische Dichte deren Grenzwert (beispielsweise 4800 FAU) überschritten hatte, wurde die Bleedpumpe (0,8 mL min<sup>-1</sup>) mittels LabManager® automatisch angestellt. Die Summe der Volumenströme des Filtrats (0,8 mL min<sup>-1</sup>) und Bleeds resultierten in einem höheren Volumenstrom der Medienzufuhr (1,6 anstatt 0,8 mL min<sup>-1</sup>), um das Volumen der Biosuspension konstant zu halten. Das Verdrängungsvolumen der Diaphragmapumpe betrug 80,14 mL. Ein ATF-Verhältnis (Verhältnis zwischen Filtrat- und ATF-Volumenstrom) von 200,35 konnte basierend auf einem ATF-

Volumenstrom von  $160,28 \text{ mL min}^{-1}$  während eines Pumpenzyklus pro Minute (ein Zyklus ist definiert als periodische vakuumbasierte Ansaugung und druckluftbasierte Verdrängung der Biosuspension durch die Diaphragmapumpe) erreicht werden.

Als Hohlfasermodule für die Zellrückhaltung wurde ein PES-Filter (Polyethersulfon) mit einer Porengröße von  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ , einem Innendurchmesser der Hohlfasern von  $1 \text{ mm}$ , einer effektiven Länge von  $20 \text{ cm}$  und einer Filterfläche von  $470 \text{ cm}^2$  eingesetzt (S02-P20U-10-N, Repligen, Waltham, MA, Vereinigte Staaten).

#### *Einfluss der Medienkomponenten auf die Produktivität*

Der vollfaktorielle experimentelle Versuchsplan wurde mit Hilfe des Programms JMP® (SAS Institute, Cary, NC, Vereinigte Staaten) generiert. Die maximale Produktkonzentration wurde als Zielgröße definiert. Die Aminosäuren Glutamat (Glu), Histidin (His), Methionin (Met) und Tyrosin (Tyr) stellten die Einflussgrößen dar, um der Zelle Energie zur Verfügung zu stellen, die nicht über den metabolischen Weg der Glucose eingeschleust wird. Der Mittelpunkt des Versuchsplans setzte sich aus der Hälfte der Maximalwerte der Aminosäuren zusammen, da eine Erniedrigung der Aminosäuren im Medium nicht möglich war.

#### *Modellierung des Upstream Processing*

Das makroskopische kinetische Modell wurde in dem Programm Aspen Custom Modeler V8.4 (Aspen Technology, Inc., Bedford, MA, USA) entwickelt. Die tägliche Zugabe an Medium während den Fed-Batch Kultivierungen wurde durch den Einsatz von Modelltermen integriert, die die Zunahme der betrachteten Substrate und das Volumen der Biosuspension berücksichtigten.

### **3.3. Methoden zu Versuchen des Downstream Processing**

#### *Wässrige Zweiphasenextraktion*

Das verwendete wässrige Zweiphasensystem (ATPS) bestand aus  $44,5 \text{ }\%$  Biosuspension,  $15,5 \text{ }\%$  Polyethylenglykol 400 (PEG400) und  $40 \text{ }\%$  eines  $40 \text{ wt}\%$  Phosphatpuffers. Der  $40 \text{ wt}\%$  Phosphatpuffer besaß eine Zusammensetzung von  $262,09 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $198,39 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$  und  $539,52 \text{ g L}^{-1}$  Reinstwasser und wurde im Anschluss durch ein Filterpapier (Whatman™ Filter, General Electric, Boston, MA, Vereinigte Staaten) mit einer Porengröße von  $2 \text{ }\mu\text{m}$  filtriert. Zur Erstellung des ATPS wurden alle Komponenten eingewogen. Die Extraktion wurde bei einem pH-Wert von  $6,0$  in  $50 \text{ mL}$  Bechergläsern bei Raumtemperatur durchgeführt. Das ATPS wurde mit Hilfe eines Magnetrührers für  $15 \text{ min}$  durchmischt. Anschließend fand die

Phasentrennung in einem Scheidetrichter innerhalb von 30 min statt. Die entstehenden Phasen wurden getrennt aufgefangen und analysiert.

#### *Diafiltration*

Die Diafiltration wurde mit Hilfe eines SARTOFLOW® Slice 200 Benchtop Systems (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Dieses bestand aus einer Pumpe (Tandem™ Model 1082), Waage (TE 4101) und Membran (30 kDa Porengröße, Hydrosart®, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Die Membran wurde durch den Sartocon® Slice 200 Holder (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mit einem Drehmoment von 20 Nm fixiert. Während jeder Diafiltration wurden 100 mL der zu diafiltrierenden Lösung eingesetzt und 5 Diafiltrationsvolumina verwendet, um die Inhaltsstoffe der Lösungen auszutauschen. Der Eingangsdruck lag bei 2 bar und der Transmembrandruck (engl. transmembrane pressure, TMP) bei 1,5 bar.

#### *Ionenaustauschchromatographie*

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit Hilfe des Kationenaustauschers Fractogel® EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup>(s) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) betrieben. Die stationäre Phase besaß eine Höhe von 10 cm und einen Durchmesser von 1 cm. Der Kationenaustauscher wurde mit zwei Pumpen (LaPrep P110, VWR International, Radnor, PA, Vereinigte Staaten), einer Mischkammer (A1174, Knauer GmbH, Berlin, Deutschland), einem Autosampler 3900 (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland), einem pH-Wert und Leitfähigkeitsdetektor (Monitor pH/C-900 General Electric, Boston, MA, Vereinigte Staaten), einem UV-Detektor (LaPrep P314, VWR International) sowie einem Fraktionssammler (Foxy Jr., Teledyne ISCO, Lincoln, NE, Vereinigte Staaten) betrieben.

Das verwendete Puffersystem für den Salzgradienten bestand aus einem Equilibrierpuffer (Puffer A, 20 mM Natriumphosphatpuffer, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0) als auch einem Elutionspuffer (Puffer B, 20 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6,0). Das verwendete Puffersystem für den pH-Gradienten bestand aus einem Laufpuffer (Puffer A, 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 4,0) als auch einem Elutionspuffer (Puffer B, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 10,0). Der Verlauf der Elution ist in Tabelle 8 zu sehen. Der Volumenstrom betrug 2 mL min<sup>-1</sup>. Die zu untersuchenden Lösungen wurden vor deren Injektion filtriert (0,2 µm Spritzenvorsatzfilter, VWR International, Radnor, PA, Vereinigte Staaten). Das Injektionsvolumen betrug bei allen Versuchen 2 mL. Die Absorption der Analyten wurde bei 280 nm aufgenommen.

**Tabelle 8:** Methode zur Elution während der Ionenaustauschchromatographie mittels Salz- und pH-Gradienten.

Salzgradient		pH-Gradient	
Zeit [min]	Puffer B [%]	Zeit [min]	Puffer B [%]
0	0	0	0
20	0	10	0
70	25	30	25
71	80	35	50
90	80	60	100
91	0	90	100
120	0	91	0
-	-	110	0
-	-	130	0

*Hydrophobe Interaktionschromatographie*

Die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde mit Hilfe des Fractogel® EMD Phenyl(s) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) betrieben. Die stationäre Phase besaß eine Höhe von 10 cm und einen Durchmesser von 1 cm. Die Instrumentation zum Betrieb der hydrophoben Interaktionschromatographie kann der Methode zur Ionenaustauschchromatographie entnommen werden. Das verwendete Puffersystem für den Salzgradienten bestand aus einem Equilibrierpuffer (Puffer A, 20 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6,0) als auch einem Elutionspuffer (Puffer B, 20 mM Natriumphosphatpuffer, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0). Der Verlauf der Elution ist in Tabelle 9 zu sehen. Der Volumenstrom betrug 2 mL min<sup>-1</sup>. Die zu untersuchenden Lösungen wurden vor deren Injektion filtriert (0,2 µm Spritzenvorsatzfilter, VWR International, Radnor, PA, Vereinigte Staaten). Das Injektionsvolumen betrug bei allen Versuchen 2 mL. Die Absorption der Analyten wurde bei 280 nm aufgenommen.

**Tabelle 9:** Methode zur Elution während der hydrophoben Interaktionschromatographie.

Zeit [min]	Puffer A [%]
0	100
24	100
25	30
85	0
114	0
115	100
145	100

### 3.4. Methoden zur Bioanalytik

#### *Kultivierung*

Die viable und totale Zellzahlkonzentration sowie die Zellviabilität wurde mit Hilfe der Trypanblaufärbung (0,4 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Vereinigte Staaten), eines Mikroskops (Motic BA 310, Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland) und eines Hämocytometers (Neubauer improved, BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland) als Doppelbestimmung während allen Kultivierungen offline quantifiziert. Zusätzlich wurde die optische Dichte (Trübung) der Biosuspension während Bioreaktorkultivierungen mittels einer *in-situ* Trübungssonde (Transmission, 880 nm, HiTec Zang GmbH, Herzogenrath, Deutschland) online detektiert, die mit der viablen beziehungsweise totalen Zellzahlkonzentration korreliert. Die Sonde wurde an einen LabManager® (HiTec Zang GmbH) angeschlossen.

Die Ramanspektroskopie wurde mittels einer *ex-situ* Ramansonde (Diodenlaser, 785 nm, Ocean Optics B.V, Ostfildern, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung der Spektraldaten fand durch den NIPALS-Algorithmus des Programms The Unscrambler® (CAMO Software AS., Oslo, Norwegen) statt.

Die Glucose- und Lactatkonzentrationen wurden mit Hilfe des LaboTRACE compact (TRACE Analytics GmbH, Braunschweig, Deutschland) als Doppelbestimmung offline quantifiziert. Die zu untersuchenden Lösungen wurden vor deren Analyse filtriert (0,2 µm Spritzenvorsatzfilter, VWR International, Radnor, PA, Vereinigte Staaten).

Die Konzentration von Ammonium, Lactat, Glutamin, Glutamat, NaCl und KCl sowie der pH-Wert und die Osmolalität in zellfreien Proben wurde mit einem BioProfile® 100plus (Nova Biomedical, Waltham, MA, Vereinigte Staaten) quantifiziert.

Die Aminosäuren der Medien wurden mit Hilfe der Umkehrphasenchromatographie (RP C<sub>18</sub>, Nucleosil 300-5, 250 x 4 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) analysiert. Vor der Analyse wurden die Aminosäuren mittels Dabsylchlorid derivatisiert [Bockhardt 1996, Krause 1995, Sethuraman 2004], um eine Wechselwirkung der Analyten mit der stationären Phase der Säule zu ermöglichen. Die Analyse wurde durch ein Agilent 1100 HPLC System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) betrieben. Das System war mit einem Autosampler (G1329A), Säulenofen (G1316A), Diodendetektor (DAD, G1330B), zwei binärer Pumpen (G1312A) und einem Entlüfter (G1312A) ausgestattet. Der Säulenofen wurde auf 50 °C eingestellt. Die Zusammensetzung der Laufmittel ist in Tabelle 10 dargestellt. Der Verlauf der Elution ist Tabelle 11 zu sehen. Es wurden 25 µL der Proben injiziert und die Detektion fand bei einer Wellenlänge von 436 nm statt.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Laufmittel für die Analyse der Aminosäuren.

Komponente	Puffer A (pH 6,6)	Puffer B
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 g	-
H <sub>2</sub> O	900 mL	20 Vol.-%
Dimethylformamid	40 mL	-
Triethylamin	2,5 mL	-
Acetonitril	-	80 Vol.-%

**Tabelle 11:** Methode zur Elution für die Analyse der Aminosäuren.

Zeit [min]	Puffer B [%]	Volumenstrom [mL min <sup>-1</sup> ]
0	10	0,25
5	15	0,25
10	25	0,25
20	30	0,25
35	32,5	0,25
40	45	0,25
50	60	0,25
60	100	0,25
75	100	0,50
80	15	0,50
85	15	0,50
100	10	0,25
105	10	0,25

*Produktkonzentration*

Die Produktkonzentration wurde mit Hilfe der Protein A Chromatographie (PA ID Poros® Protein A Sensor Cartridge 30 x 2,1 mm, Applied Biosystems, Waltham, MA, Vereinigte Staaten) quantifiziert. Als Equilibrierpuffer wurde Dulbecco's PBS Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Dulbecco's PBS Puffer bei einem pH-Wert von 2,6 wurde als Elutionspuffer eingesetzt. Die Analyse wurde bei einem Volumenstrom von 1,6 mL min<sup>-1</sup> durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 15 µL. Als Kalibrierung wurde gammanorm® (165 g L<sup>-1</sup>, Octopharma AG, Lachen, Schweiz) eingesetzt. Die Instrumentation zum Betrieb der Protein A Chromatographie kann der Methode zur Aminosäurenanalytik entnommen werden. Die Absorption der Analyten wurde bei 280 nm aufgenommen.

*Produktreinheit und NebenkompONENTENPROFIL*

Die Produktreinheit wurde mit Hilfe der SEC und 2D-Gelelektrophorese analysiert. Die SEC wurde mit Hilfe der chromatographischen Säule Yarra™ SEC-3000 (3 µm, 300 x 4,6 mm, Phenomenex Inc.,



Torrance, CA, Vereinigte Staaten) durchgeführt. Als Puffer für die isokratische Analyse wurde eine Lösung bestehend aus 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 0,1 M Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6,6 eingesetzt. Die Instrumentation zum Betrieb der Größenausschlusschromatographie kann der Methode zur Aminosäurenanalytik entnommen werden. Die Absorption der Analyten wurde bei 280 nm aufgenommen. Der Volumenstrom betrug 0,35 mL min<sup>-1</sup>.

Die isoelektrische Fokussierung (IEF), die der Gelelektrophorese vorausging, wurde mit IPG Streifen (ReadyStrip™ IPG Strips, linear, pH 3 - 10, BIO-RAD, Hercules, CA, Vereinigte Staaten) und einer IEF 100 Einheit (Hoefer Inc., Holliston, MA, Vereinigte Staaten) nach Herstellervorgaben durchgeführt. Für die anschließende SDS PAGE wurden vorgefertigte Gele (Criterion TGX Precast Gel, 4 - 15 % Bis-Tris, BIO-RAD), Puffer und eine Elektrophoresekammer (BIO-RAD) verwendet. Die hieraus entstehenden Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (VWR International, Radnor, PA, Vereinigte Staaten) angefärbt.

Für die Identifikation der Proteine wurden Stellen auf dem SDS-Gel ausgewählt, ausgeschnitten und in 1 mm<sup>2</sup> Stücke reduziert. Die Disulfidbindungen der Proteine wurden anschließend mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) reduziert und die Proteine wurden mit 50 mM Iodacetamid alkyliert. Anschließend fand ein proteolytischer Aufschluss der Proteine im Gel mit Hilfe von 8 ng µL<sup>-1</sup> Trypsin (Promega, Madison, WI, Vereinigte Staaten) bei 37 °C über Nacht statt. Die Peptide wurden mit 65 % Acetonitril und 5 % Ethansäure in Reinstwasser aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel vollständig verdampft. Die Peptide wurden in 20 µL 0,1 % Methansäure resuspendiert und mittels LC-MS/MS analysiert [Kornecki 2017]. Das System bestand aus einem nano-UPLC-System (nanoACQUITY, Water, Manchester, Vereinigtes Königreich), einer Elektrosprayionisation (ESI) zur Erzeugung von Ionen und einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS), welches aus einem Quadrupol und einem Orbitrap (Orbitrap QExactive, Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) zusammengesetzt war.

#### *Produktqualität*

Die Sekundärstruktur des monoklonalen Antikörpers wurde mittels ATR-FTIR Analysen charakterisiert (ALPHA II, Bruker Corporation, Billerica, MA, Vereinigte Staaten). Für die Analysen wurde der monoklonale Antikörper zuvor mit Hilfe der Protein A Chromatographie aufgereinigt, um Absorptionen von Nebenkomponten während der Messung zu vermeiden.



## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Erweiterte Prozesskontrolle

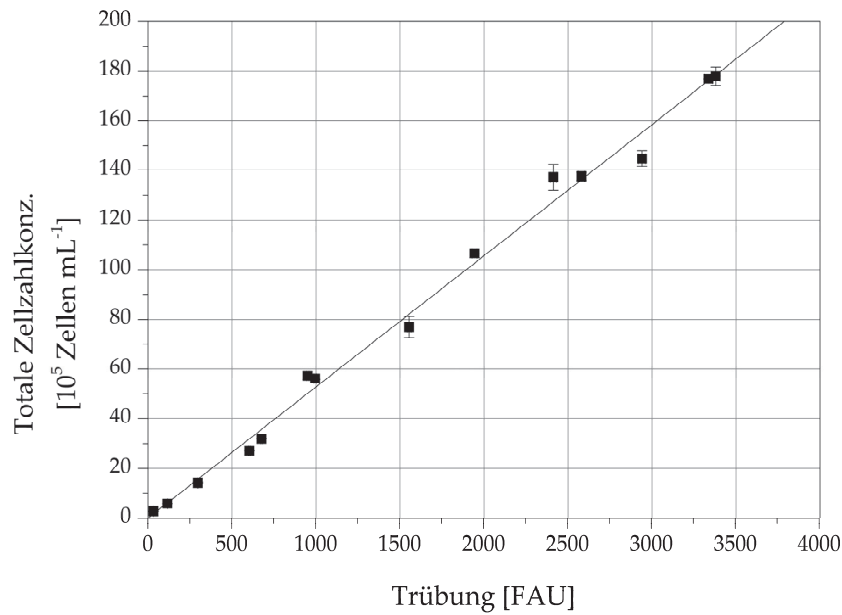
Das Grundprinzip der Korrelationen zwischen Prozess-, Status- und Zielvariablen ist in Abbildung 2 zu sehen. Diese Beziehungen, zusammen mit den Ergebnissen der online *in-situ* Trübungsmessung und der *ex-situ* Raman Spektroskopie, werden im Folgenden gezeigt und diskutiert.

#### 4.1.1. Process Analytical Technology

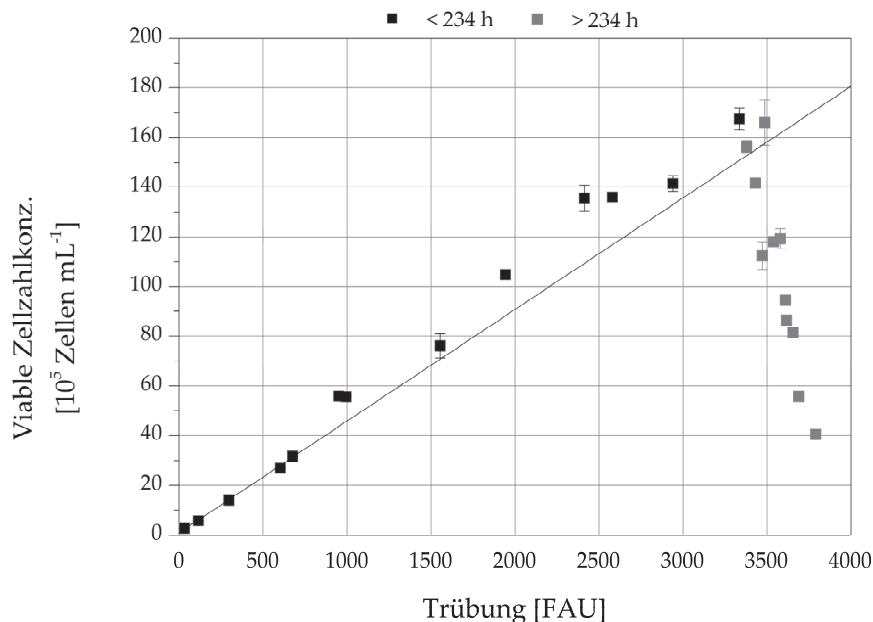
##### *Fed-Batch*

Die *in-situ* Messung der optischen Dichte (Trübung) der Biosuspension ist eine einfache und häufig angewendete Methode um die Biomasse im Bioreaktor zu überwachen [Biechele 2015, Kroll 2017b]. In diesem Ansatz wurde eine Transmissionssonde verwendet, die online *in-situ* die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 880 nm misst, um so die totale Zellzahlkonzentration während der Kultivierung der tierischen Zelllinie CHO DG44 aufzunehmen.

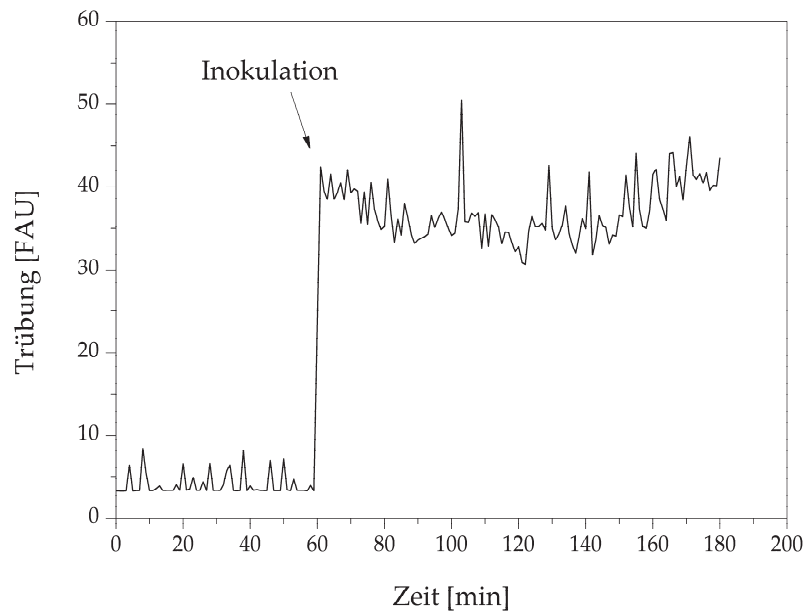
Die Korrelation zwischen den Trübungsdaten (engl. formazine attenuation unit, FAU) und der totalen Zellzahlkonzentration ( $10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) ist als Beispiel einer Suspensionskultur in Abbildung 5 dargestellt ( $R^2 \geq 0,99$ ). Die lineare Korrelation ist in guter Übereinstimmung für zwei Kultivierungen im Bioreaktor ( $R^2 \geq 0,97 \pm 0,02$ ). Die online gemessene Trübung korreliert ebenfalls mit der viablen Zellzahlkonzentration, solange die Zellviabilität (Quotient aus viabler und totaler Zellzahlkonzentration) nicht geringer als  $90 \pm 2 \%$  (234 h Kultivierung) ist, wie in Abbildung 6 zu sehen. Diese Diskrepanz limitiert die Anwendung der Trübungssonde für die Messung der viablen Zellzahlkonzentration, da dieses Sensorsystem nicht zwischen viabler und toter Zellmasse unterscheiden kann, sondern nur die optische Dichte der Biosuspension misst. Zusätzlich resultiert die geringe optische Dichte des Mediums in einen Versatz (Offset) der gemessenen Trübung vor der Inokulation von  $4,00 \pm 1,42$  FAU. Im Anschluss an die Inokulation (Start der Kultivierung durch die Zugabe der Vorkultur in den Bioreaktor) steigt die Trübung eine Stunde nach Inokulation auf  $36,97 \pm 3,65$  FAU, wie in Abbildung 7 zu sehen. In Abbildung 7 ist zudem erkennbar, dass Luftblasen oder Partikelaggregate bei zirka 105 Minuten signifikante Schwankungen in den Trübungsdaten bei geringen Trübungswerten verursachen.



**Abbildung 5:** Korrelation zwischen der offline bestimmten totalen Zellzahlkonzentration ( $10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) und der online gemessenen Trübung (880 nm, FAU). Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration als auch den Messfehler der Trübungssonde (0,75 %). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Beziehung beträgt 0,993.



**Abbildung 6:** Korrelation zwischen der offline bestimmten viablen Zellzahlkonzentration ( $10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) und der online gemessenen Trübung (880 nm, FAU) vor (schwarz) und nach (grau) 234 h Kultivierung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration als auch den Messfehler der Trübungssonde (0,75 %). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Beziehung beträgt bis 234 h Kultivierung 0,987.

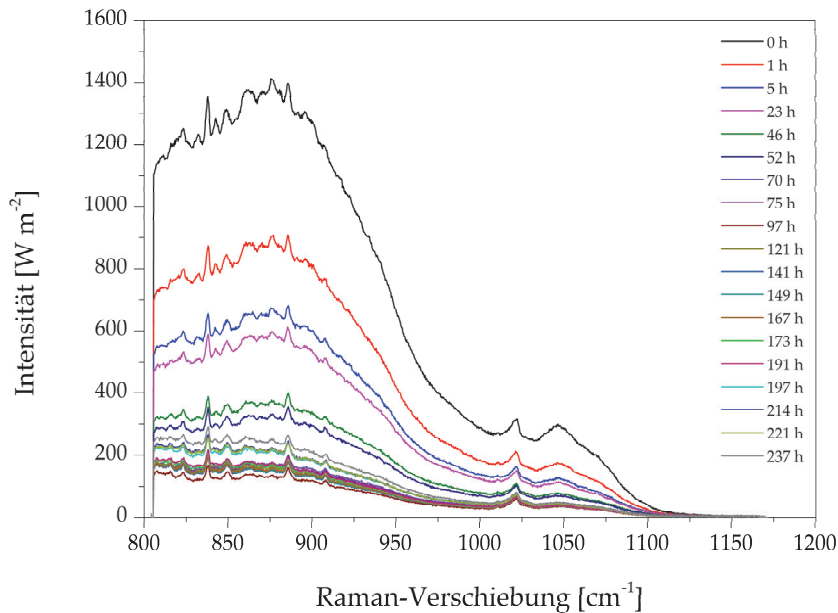


**Abbildung 7:** Der mit Hilfe der optischen Dichte (Trübung bei 880 nm) aufgenommene Inokulationszeitpunkt der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 in Suspension.

Mit Hilfe der Korrelation aus Abbildung 5 und der linearen Regression ( $X_T [10^5 \text{ Zellen mL}^{-1}] = (0,053 \pm 0,005) \cdot \text{Trübung [FAU]} + (0,017 \pm 0,589)$ ) kann die Trübung nach der Inokulation in eine totale Zellzahlkonzentration von  $2,04 \pm 0,30 \cdot 10^5 \text{ Zellen mL}^{-1}$  umgerechnet werden, was einer typischen Zellzahlkonzentration zu Beginn der Kultivierung von CHO entspricht [Suttle 2018]. Die über die Korrelation berechnete Inokulumskonzentration besitzt jedoch eine Abweichung von zirka  $0,96 \cdot 10^5 \text{ Zellen mL}^{-1}$  zur angestrebten Zellzahlkonzentration von  $3,0 \cdot 10^5 \text{ Zellen mL}^{-1}$ . Im Vergleich mit der offline gemessenen totalen Zellzahlkonzentration von  $2,75 \pm 0,05 \cdot 10^5 \text{ Zellen mL}^{-1}$  existiert eine Diskrepanz zwischen online und offline Messung. Diese Diskrepanz ist auf die Messschwankungen des Sensorsystems und des Kalibrierungsbereichs zurückzuführen. Die Messschwankungen, die womöglich durch Gasblasen entstanden, können durch eine Neuposition des Messspalts im Bioreaktor eliminiert werden. Der Bereich der Kalibrierung der Sonde kann zusätzlich verringert werden, wodurch die Genauigkeit steigt und Messschwankungen minimiert werden. Die Kalibrierung und die anschließende Messung muss aufgrund der steigenden optischen Dichte (Wachstum der Zellen) einen Bereich von mindestens zirka 10 bis maximal zirka 4000 FAU abdecken.

Nichtsdestotrotz kann mit Hilfe der Messung der optischen Dichte der exakte Zeitpunkt der Inokulation beobachtet werden, wodurch Prozessvariationen minimiert werden.

Eine weitere Methode Prozessvariablen wie die Zellzahlkonzentration online zu bestimmen ist die Raman-Spektroskopie [Musmann 2016]. Die Spektraldaten, die mit Hilfe einer *ex-situ* Sonde im Verlauf der Kultivierung erhalten werden, sind beispielhaft in Abbildung 8 zu sehen. Die Auswertung der Spektraldaten benötigt multivariate Datenanalysen, da die komplexe Kultivierungssuspension aus mehreren, teilweise ähnlichen Substanzen besteht.

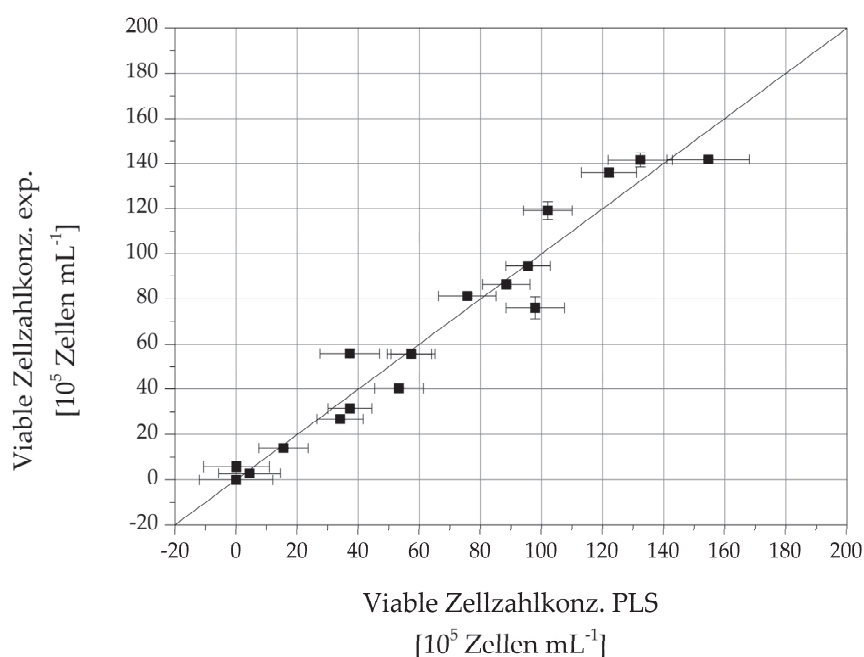


**Abbildung 8:** Beispielhafte Spektraldaten der Raman-Spektroskopie im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 in Suspension.

Die Analyse der multivariaten Daten erfolgt für gewöhnlich mittels Hauptkomponentenanalyse und der Regression der partiellen kleinsten Quadrate (PLS, engl. Partial Least Squares Regression) [Lourenço 2012, Otto 2017]. Bei diesen Methoden wird eine Hauptachsentransformation durchgeführt, um mehrdimensionale Merkmale in einen Vektorraum mit neuer Basis zu überführen. Das Ziel ist eine Minimierung der Dimensionen, die durch die Beschreibung der Datenvarianz durch Hauptkomponenten erreicht wird. Die Varianz der Spektraldaten gibt Auskunft über mögliche Änderungen von Prozessvariablen wie der Zellzahlkonzentration. Im Anschluss an die Regression der partiellen kleinsten Quadrate wird ein PLS-Modell errichtet, welches quantitativ die Varianz der Spektraldaten mit der Varianz der Prozessvariablen korreliert. Die PLS-Modellvalidierung erfolgt für vorläufige Machbarkeitsstudien mit Hilfe des Kreuzvalidierungsverfahrens. Die PLS-Modellgüte wird jedoch durch die Verwendung eines

separaten Validierungsdatensatzes verbessert, wodurch die Genauigkeit der Regression bei anschließender Anwendung des PLS-Modells erhöht wird [Zhao 2015].

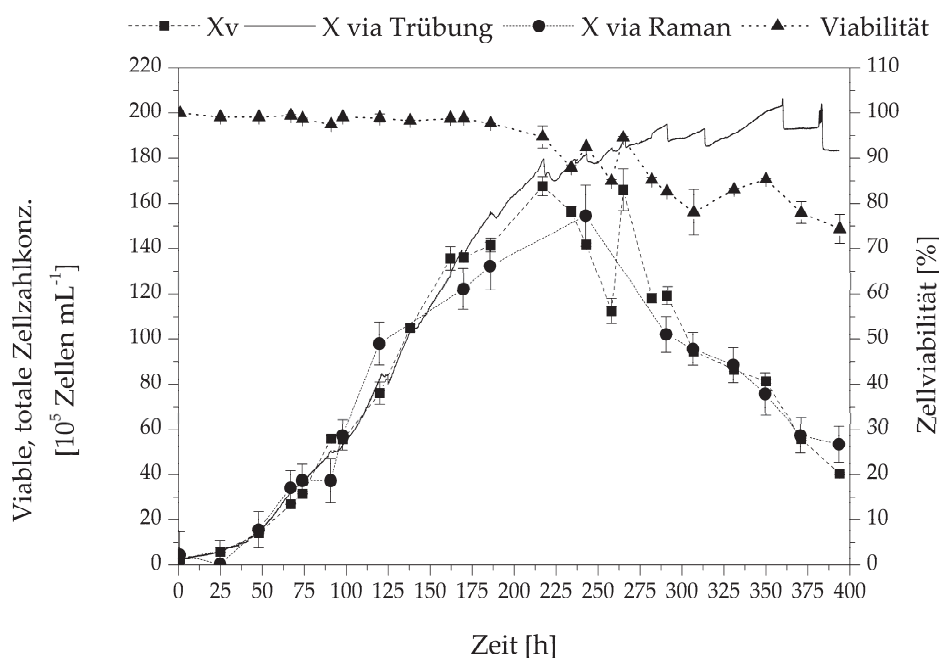
In Abbildung 9 ist das Ergebnis einer PLS-Regression gezeigt, die auf der *ex-situ* Messung des Raman-Signals (785 nm) der Biosuspension (Kultivierungsmedium inklusive Zellmasse) im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG 44 basiert.



**Abbildung 9:** *Ex-situ* Messung des Raman-Shifts der Biosuspension im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG 44. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration als auch den Fehler der PLS-Regression ( $\text{RMSE} \leq 13,82 \cdot 10^5$  Zellen mL<sup>-1</sup>).

Mit Hilfe der PLS-Regression ist die Beziehung zwischen der viablen Zellzahlkonzentration und den Raman-Spektraldaten darstellbar. Die lineare Korrelation ist mit einem  $\text{RMSE} \leq 13,82 \cdot 10^5$  Zellen mL<sup>-1</sup> (engl. root-mean-square error, Wurzel aus dem mittleren quadratischen Fehler) der PLS-Regression in guter Übereinstimmung zu den offline gemessenen viablen Zellzahlkonzentrationen ( $R^2 \geq 0,95$ ). Der Vorteil spektroskopischer Methoden wie der Raman- oder NIR/MIR-Spektroskopie für die quantitative Bestimmung von Prozessvariablen wie der Zellzahlkonzentration ist die Fähigkeit der Differenzierung ähnlicher Prozessvariablen mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse. In Abbildung 10 ist der Unterschied der verwendeten Sensorsysteme im Verlauf einer Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 zu sehen. Die PLS-Regression ist in der Lage die abnehmende viable Zellzahlkonzentration in der Sterbephase der Kultivierung (ab 250 h Kultivierung) quantitativ zu erfassen. Wie in Abbildung 6 und Abbildung 10 zu sehen, korreliert die Trübung der Biosuspension ab einer Kultivierungszeit von 234 h nicht mehr

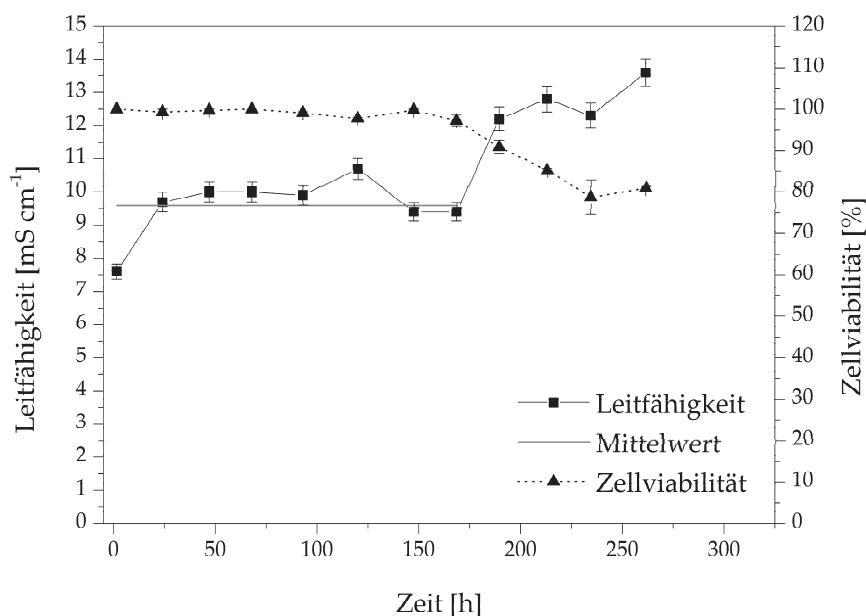
mit der viablen Zellzahlkonzentration. Das PLS-Modell wird jedoch mit Hilfe der viablen Zellzahlkonzentration errichtet und ist dementsprechend in der Lage diese Prozessvariable über den gesamten Verlauf der Kultivierung quantitativ zu bestimmen. Die auf den Trübungsdaten basierende ansteigende totale Zellzahlkonzentration nach 234 h ist auf eine Zellakkumulation im Sensorspalt zurückzuführen, die nach einer Neuposition des Sensors nicht erneut auftrat. Die Abnahme der viablen Zellzahlkonzentration nach 200 h basiert auf einer Zellakkumulation innerhalb der *ex-situ* Durchflusszelle für die Raman-Spektroskopie. Nach einer Erhöhung des Fördervolumenstroms der Kultivierungssuspension durch den Probenkreislauf stieg die viable Zellzahlkonzentration an (zirka 260 h).



**Abbildung 10:** Verlauf der viablen und totalen Zellzahlkonzentration nach PLS-Regression und Trübungsmessung im Vergleich zu der offline gemessenen viablen Zellzahlkonzentration. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration als auch den Fehler der PLS-Regression ( $\text{RMSE} \leq 13,82 \cdot 10^5 \text{ Zellen mL}^{-1}$ ).

Eine mögliche Kombination der *in-situ* Trübungssonde mit einer *in-situ* Leitfähigkeitssonde kann die Verringerung der Zellviabilität qualitativ erfassen, wie in Abbildung 11 erkennbar. Während der Sterbephase setzen lysierende Zellen unter anderem Kalium und Aminosäuren frei, die die Leitfähigkeit einer Lösung erhöhen können. Die Leitfähigkeit der offline gemessenen, zellfreien Kultivierungslösung besitzt bei einer hohen Zellviabilität (> 90 %, bis 168 h Kultivierung) einen Wert von  $9,59 \pm 0,90 \text{ mS cm}^{-1}$ . Sobald die Zellyse einsetzt und intrazelluläres Kalium frei wird, steigt die Leitfähigkeit signifikant auf einen Wert von  $12,20 \pm 0,37 \text{ mS cm}^{-1}$  an. Die andauernde Erniedrigung

der Zellviabilität ( $80,9 \pm 0,6 \%$ , Ende der Kultivierung bei 264 h) resultiert in einer Erhöhung der Leitfähigkeit ( $13,60 \pm 0,41 \text{ mS cm}^{-1}$ , Ende der Kultivierung bei 264 h). Mit Hilfe der simultanen Messung der optischen Dichte und Leitfähigkeit der Biosuspension ist nicht nur der Inokulumszeitpunkt und der Verlauf der Kultivierung *in-situ* und online messbar, sondern auch die einsetzende Zelllyse in der Sterbephase der Kultur.

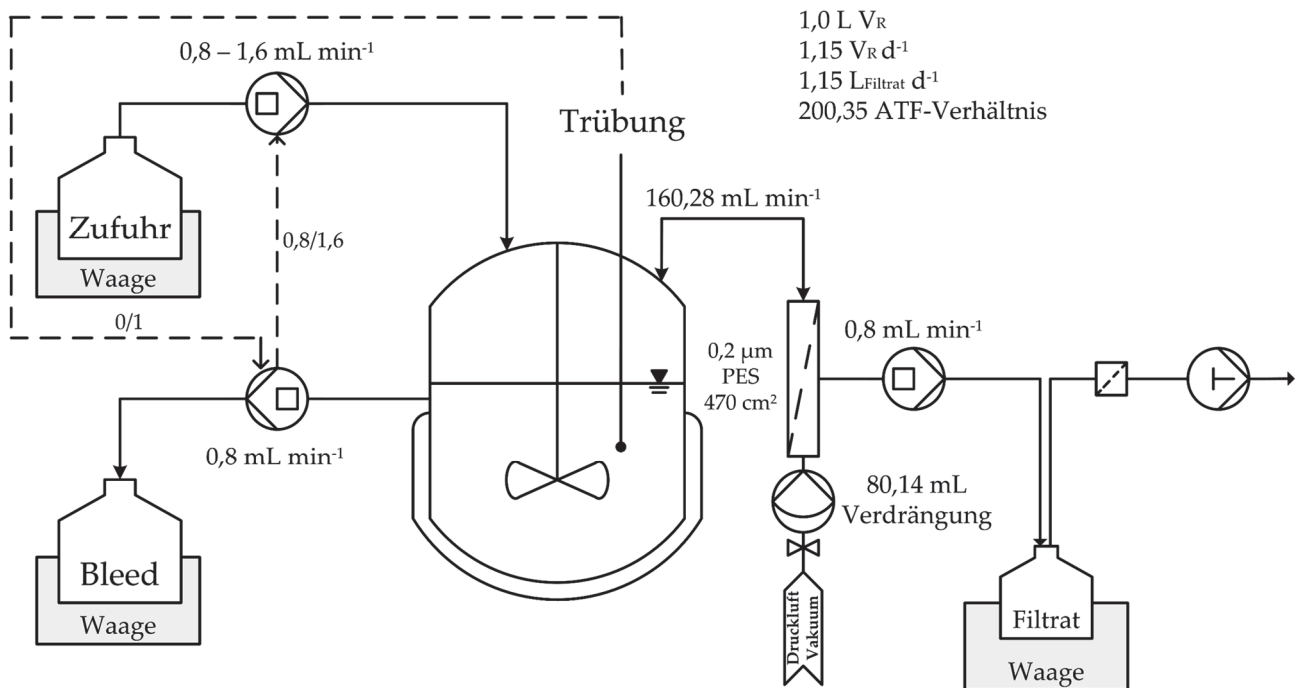


**Abbildung 11:** Leitfähigkeit und Zellviabilität im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG 44 in Suspension. Die horizontale Linie spiegelt den arithmetischen Mittelwert der Leitfähigkeit bei hoher Zellviabilität ( $> 90 \%$ ) wider. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Viabilität als auch den Messfehler der Leitfähigkeitssonde ( $3 \%$ ).

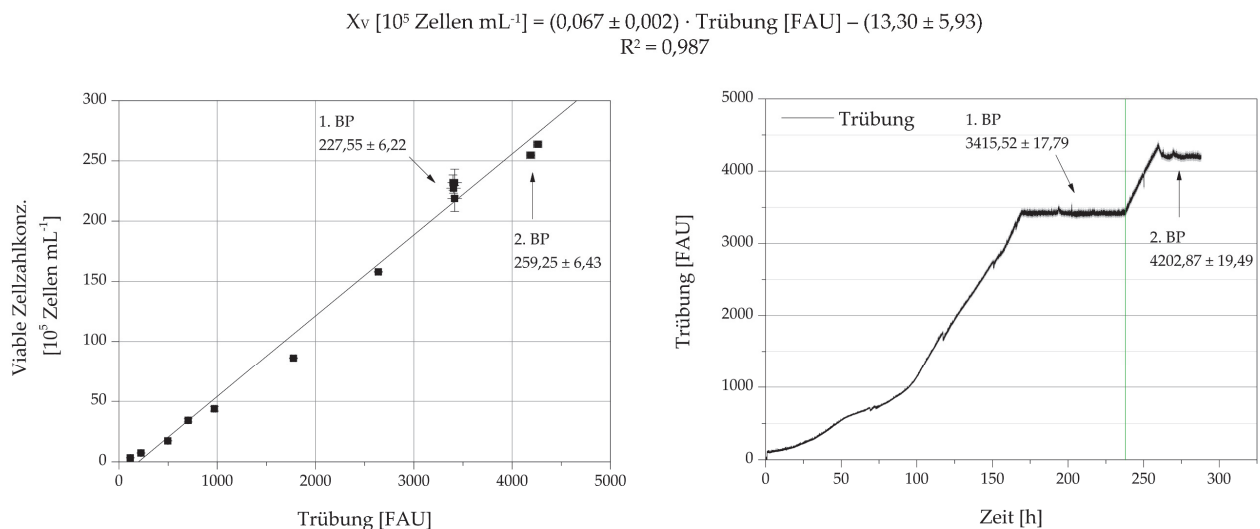
#### Kontinuierliche Kultivierung – Turbidostat

Die kontinuierliche Kultivierung ist eine Verfahrensweise von Bioreaktoren, mit derer Hilfe die volumetrische Produktivität während der Herstellung rekombinanter Produkte erhöht werden kann. In Abbildung 12 ist schematisch die verwendete kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückhaltung (Perfusion) und die Kontrollstrategie mit Hilfe einer *in-situ* Trübungssonde, Zufuhr-, Filtrat- und Bleedpumpe zu sehen. Die Trübungssonde kann analog zu Fed-Batch Prozessen bei einer hohen Zellviabilität ( $> 90 \%$ ) für die online Bestimmung der viablen Zellzahlkonzentration eingesetzt werden. Der Vorteil von kontinuierlichen Kultivierungen ist die einstellbare Durchflussrate, wodurch für das Zellwachstum toxische oder hemmende Komponenten verdrängt werden und durch frisches Medium ersetzt werden. Mit Hilfe dieser Methode kann eine

hohe Zellviabilität und eine lineare Regression der Trübung und viabler Zellzahlkonzentration über den gesamten Verlauf der Kultivierung hergestellt werden, wie in Abbildung 13 zu sehen.



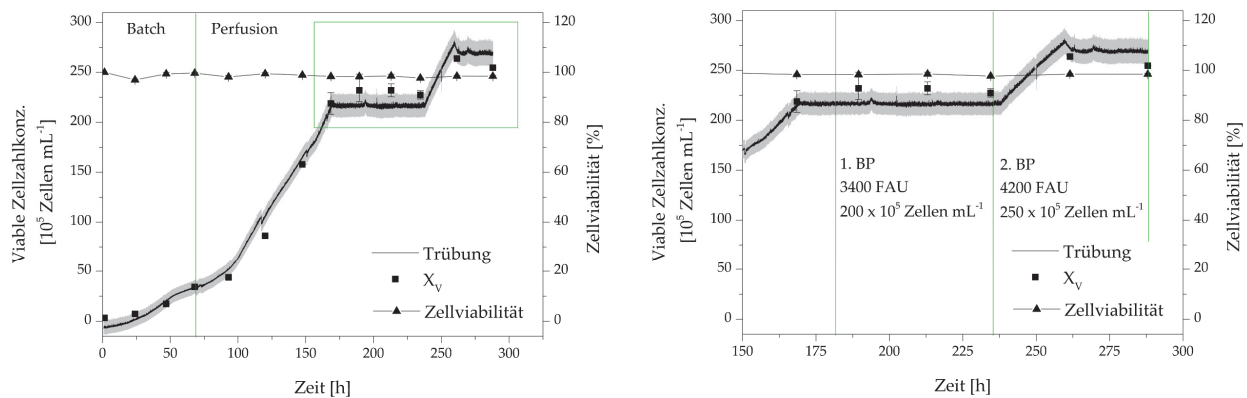
**Abbildung 12:** Schematischer Überblick über die verwendete kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückhaltung (Perfusion) und die Kontrollstrategie mit Hilfe einer in-situ Trübungssonde, Zufuhr-, Filtrat- und Bleedpumpe.



**Abbildung 13:** Lineare Korrelation ( $R^2 \geq 0,98$ ) der viablen Zellzahlkonzentration und Trübung inklusive der zwei Betriebspunkte (links) und der Regressionsgleichung sowie der Verlauf der Trübung über die kontinuierliche Kultivierung (rechts). Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration (links). Die graue Umhüllungskurve repräsentiert den Messfehler der Trübungssonde (0,75 %, rechts).



Mit Hilfe der linearen Regression aus Abbildung 13 ( $R^2 \geq 0,98$ ) kann die online gemessene optische Dichte der Biosuspension in die viable Zellzahlkonzentration umgerechnet werden, wie in Abbildung 14 zu sehen. Die offline bestimmte viable Zellzahlkonzentration kann mit Hilfe der online gemessenen Trübung beschrieben werden und liegt innerhalb des Bereichs des durch den Messfehler der Sonde und dem Fehler der linearen Regression verursachten, fortgepflanzten Fehlers (graue Umhüllungskurve).

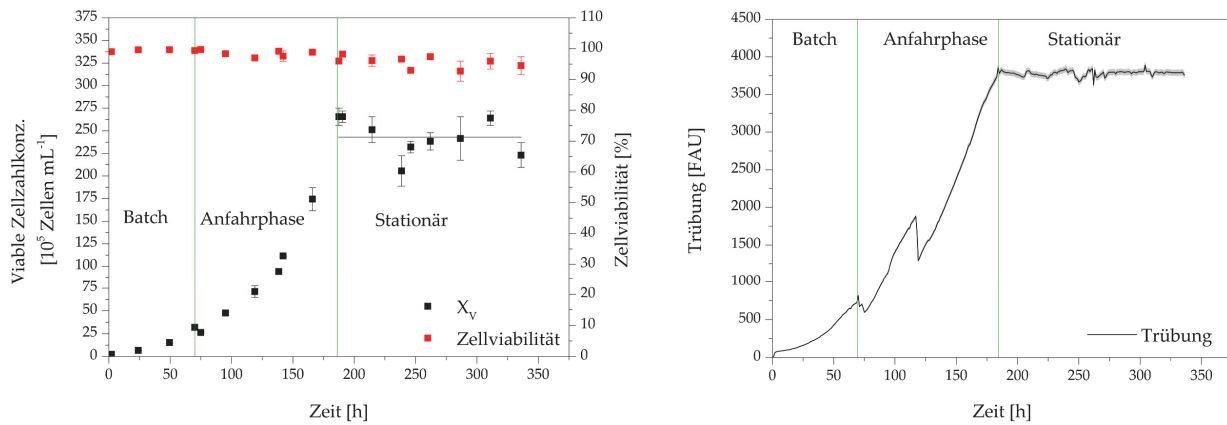


**Abbildung 14:** Vergleich der viablen Zellzahlkonzentration mittels Offlineanalyse und online Trübungsmessung (links). Detaillierte Betrachtung der zwei Betriebspunkte nach 150 h Kultivierung (rechts). Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration. Die graue Umhüllungskurve repräsentiert den fortgepflanzten Fehler basierend auf dem Messfehler der Sonde (0,75 %) und dem Fehler der linearen Regression aus Abbildung 13.

Der quasi-stationäre Zustand als auch das Anfahren der zwei eingestellten Betriebspunkte sind in Abbildung 14 (rechts) erkennbar. Das Überschwingen der Trübung während des Anfahrens in den zweiten Betriebspunkt kann durch eine Erhöhung der Volumenströme der Bleed- und Zufuhrpumpe (siehe Abbildung 12) minimiert werden. Nichtsdestotrotz kann diese Prozessführung für die Anwendung eines Turbidostats eingesetzt werden. Eine Waage, auf der der Bioreaktor platziert wird oder hochaufgelöste Füllstandssensoren können des Weiteren verwendet werden, um das Füllvolumen des Bioreaktors zu überwachen. Mit Hilfe dieser Erweiterung sind potentielle Störfälle wie Pumpenausfälle, Sensordefekte oder Handhabungsfehler schneller detektier- und behebbar.

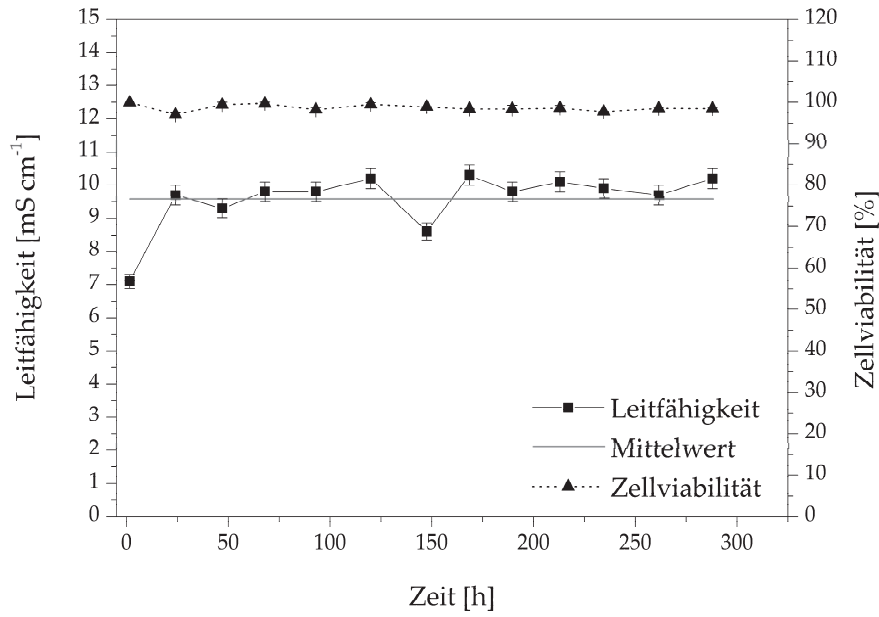
Ein ATF-Verhältnis (engl. alternating tangential flow, alternierender Tangentialfluss) des Permeats ( $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ ) und der ATF-Flussrate ( $160,28 \text{ mL min}^{-1}$ ) von 200,35 wurde während der kontinuierlichen Kultivierung erreicht, was für den verwendeten Maßstab einem typischen Verhältnis entspricht [Repligen Corporation 2018].

Die einzelnen Phasen der kontinuierlichen Kultivierung mittels Perfusion als Turbidostat sind in Abbildung 15 zu sehen.



**Abbildung 15:** Offline bestimmte, viable Zellzahlkonzentration und -viabilität (links) als auch online gemessene Trübung (rechts) im Verlauf einer kontinuierlichen Kultivierung, eingeteilt in die Batch-, Anfahr- und stationäre Phase. Die horizontale Linie gibt den arithmetischen Mittelwert der viablen Zellzahlkonzentration ( $24,30 \pm 1,96 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) während der stationären Phase an. Die Fehlerbalken repräsentieren die offline Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration und -viabilität.

Die Kultivierung beginnt mit einer Batch-Phase bis eine viable Zellzahlkonzentration von zirka  $2,0 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  erreicht wird (70 h Kultivierung,  $3,19 \pm 0,31 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ). Anschließend wird durch das Starten der jeweiligen Pumpen die Perfusion initiiert. Die Erniedrigung der Zellzahlkonzentration nach der Initiation resultiert aus einer Adaption der Zellen an die Umgebungsparameter und dem Anfahren in die kontinuierliche Phase. Die Anfahrphase wird bis zum Erreichen des Sollwerts der viablen Zellzahlkonzentration beibehalten, ab der die Anfahrphase in die stationäre Phase übergeht (187,5 h Kultivierung,  $26,56 \pm 0,96 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ). Die in Abbildung 15 gezeigte stationäre Phase wurde 148,5 h lang bei einem Sollwert von  $25,0 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  mit Hilfe der online gemessenen Trübung bei einer mittleren viablen Zellzahlkonzentration von  $24,30 \pm 1,96 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  betrieben. Die Zellviabilität besaß einen arithmetischen Mittelwert von  $97,3 \pm 2,1$  % über den gesamten Zeitraum der Kultivierung (336 h), wodurch die viable Zellzahlkonzentration mittels Trübungsmessung geregelt werden konnte. Die Daten der offline Leitfähigkeitsmessung in Abbildung 16 zeigen eine mittlere Leitfähigkeit von  $9,58 \pm 0,87$   $\text{mS cm}^{-1}$  während der kontinuierlichen Kultivierung. Dies zeigt eine mögliche Implementierung von *in-situ* Leitfähigkeitssonden, um die Zellviabilität während Fed-Batch (Abbildung 11) und kontinuierlichen Kultivierungen (Abbildung 16) online zu verfolgen.



**Abbildung 16:** Leitfähigkeit und Zellviabilität im Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung von CHO DG44 in Suspension. Die horizontale Linie spiegelt den arithmetischen Mittelwert der Leitfähigkeit wider. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Viabilität als auch den Messfehler der Leitfähigkeitssonde (3 %).

#### 4.1.2. Modellierung der Kultivierung von Säugetierzellen – Digitaler Zwilling

Ein physikochemisches Prozessmodell der Kultivierung tierischer Organismen verbessert das Prozessverständnis und ist durch eine Integration in die Prozesssteuerung in der Lage die Prozessrobustheit zu erhöhen. Das Prozessmodell muss für diese Modellaufgabe die experimentellen Phänomene quantitativ, valide und robust abbilden können. Die Aufgabe des Prozessmodells besteht hier in der Abbildung essentieller Prozessgrößen der Kultivierung wie der viablen Zellzahl-, Glucose- und Lactatkonzentration. Diese Informationen sollen anschließend mit Hilfe geeigneter Sensorsysteme (siehe Tabelle 4) verknüpft werden, um diese Prozessgrößen im Anschluss online, prozessunterstützend zu erfassen.

Basierend auf der Literatur und experimentellen Ergebnissen (Abbildung 17) wurden die folgenden Modellgleichungen nach Xing [2010] errichtet.

$$\frac{dX_V}{dt} = (\mu - \mu_d) \cdot X_V, \quad (4.1)$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[GLC]}{K_{glc} + [GLC]} \cdot \frac{[GLN]}{K_{gln} + [GLN]} \cdot \frac{K_{llac}}{K_{llac} + [LAC]} \cdot \frac{K_{lamm}}{K_{lamm} + [AMM]} \quad (4.2)$$

$$\mu_d = k_d \cdot \frac{[LAC]}{K_{Dlac} + [LAC]} \cdot \frac{[AMM]}{K_{Damm} + [AMM]} \quad (4.3)$$

$$\frac{d[\text{GLC}]}{dt} = - \left( \frac{\mu - \mu_d}{Y_{X_V/\text{glc}}} + m_{\text{glc}} \right) \cdot X_V, \quad (4.4)$$

$$\frac{d[\text{LAC}]}{dt} = Y_{\text{lac}/\text{glc}} \cdot \left( \frac{\mu - \mu_d}{Y_{X_V/\text{glc}}} \right) \cdot X_V, \quad (4.5)$$

$$\frac{d[\text{GLN}]}{dt} = - \left( \frac{\mu - \mu_d}{Y_{X_V/\text{gln}}} + m_{\text{gln}} \right) \cdot X_V, \quad (4.6)$$

$$m_{\text{gln}} = \frac{a_1 \cdot [\text{GLN}]}{a_2 + [\text{GLN}]}, \quad (4.7)$$

$$\frac{d[\text{AMM}]}{dt} = Y_{\text{amm}/\text{gln}} \cdot \left( \frac{\mu - \mu_d}{Y_{X_V/\text{gln}}} \right) \cdot X_V - r_{\text{amm}} \cdot X_V, \quad (4.8)$$

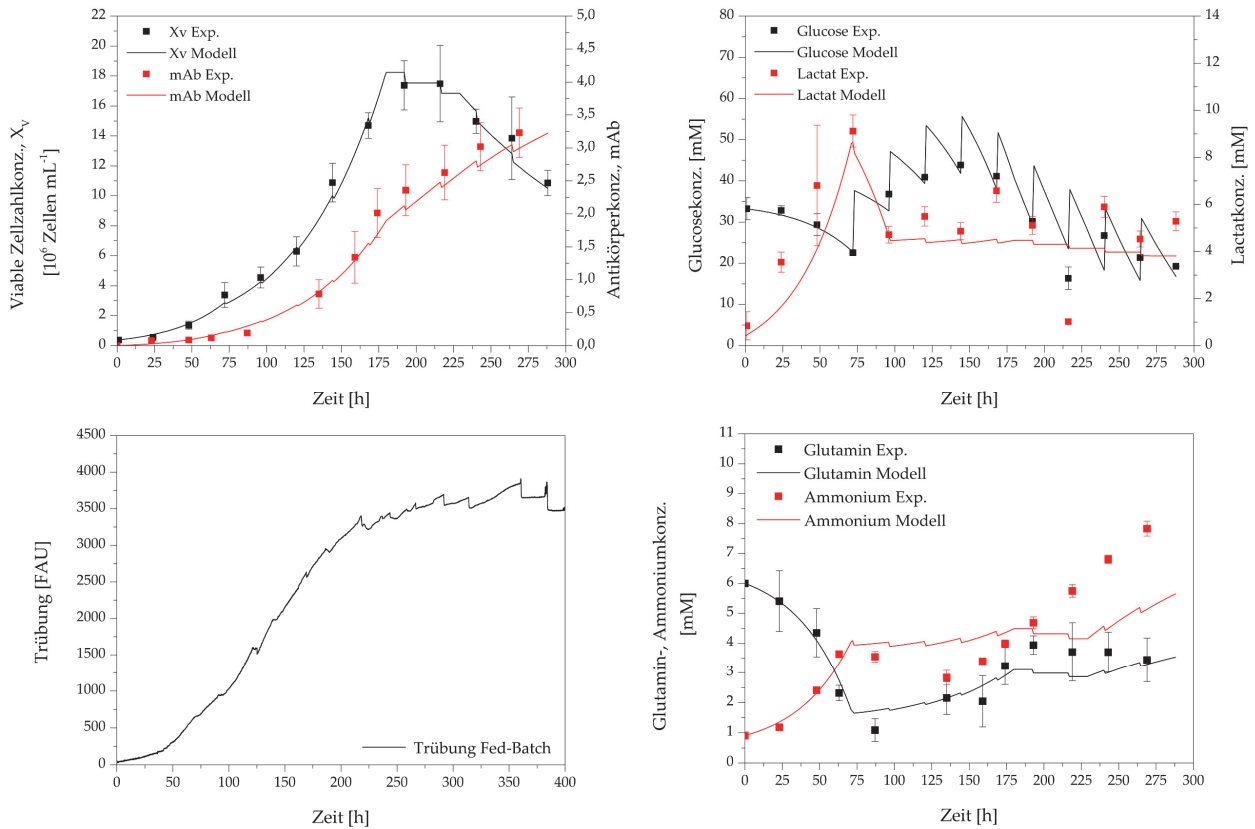
$$\frac{d[\text{mAb}]}{dt} = Q_{\text{mAb}} \cdot X_V, \quad (4.9)$$

Die Modellgleichungen basieren auf limitierenden Substrat- und inhibierenden Metabolitkonzentrationen, wie in Gleichung (4.2) und (4.3) zu sehen. Höhere Substratkonzentrationen resultieren in höheren spezifischen Wachstumsraten  $\mu$ , wohingegen höhere Metabolitkonzentrationen das Zellwachstum durch eine niedrigere spezifische Wachstumsrate und höhere spezifische Sterberate  $\mu_d$  inhibieren. Die apparente Wachstumsrate ( $\mu$  minus  $\mu_d$ ) ist demnach von dem Substratverbrauch und der Metabolitakkumulation abhängig. Modellparameter wie der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/\text{glc}}$  oder  $K_{\text{glc}}$  können mit Hilfe experimenteller Daten quantitativ erfasst werden oder durch Literaturdaten ergänzt werden. Ausbeutekoeffizienten können aufgrund des dynamischen Verhaltens einer Kultur systematisch in die Lag-, exponentielle, stationäre und Sterbephase eingeteilt werden [Al-Rubeai 2015, Chmiel 2011]. Die für die Lag-Phase verwendeten Modellparameter sind in Tabelle 12 aufgelistet. Die Modellparameter für die restlichen drei Phasen sind im Anhang (Tabelle A.1 bis A.3) dargestellt.

**Tabelle 12:** Verwendete Modellparameter als Beispiel für die Lag-Phase der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 in Suspension. Exp., Experiment; Lit., Literatur.

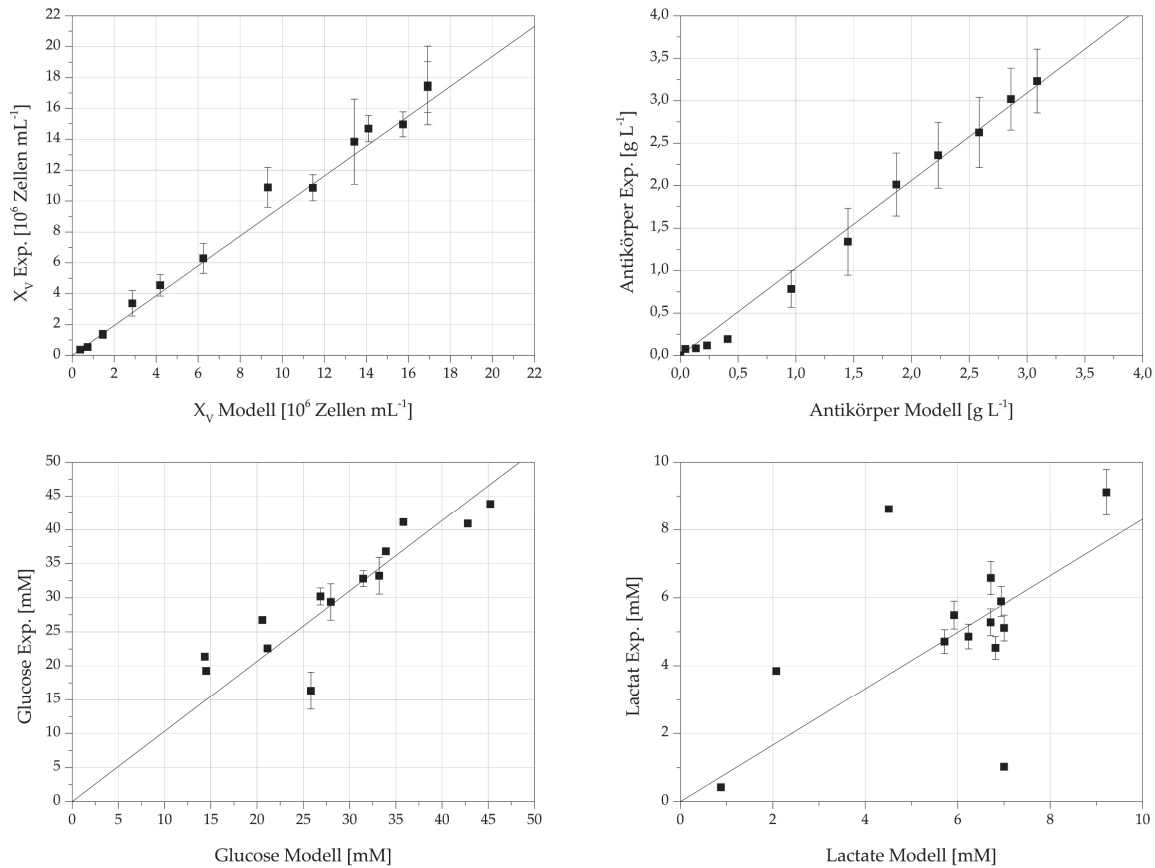
Parameter	Beschreibung	Wert	Einheit	Referenz
$X_{V,start}$	Viable Zellzahlkonz. zu Beginn	0,37	$10^6$ Zellen $\text{mL}^{-1}$	Exp.
$GLC_{start}$	Glucosekonzentration zu Beginn	33,24	mM	Exp.
$GLN_{start}$	Glutaminkonzentration zu Beginn	6,0	mM	Exp.
$LAC_{start}$	Lactatkonzentration zu Beginn	0,42	mM	Exp.
$AMM_{start}$	Ammoniumkonzentration zu Beginn	0,91	mM	Exp.
$\mu_{max}$	Maximale Wachstumsrate	0,029	$\text{h}^{-1}$	Exp.
$k_d$	Maximale Sterberate	0,0066	$\text{h}^{-1}$	Exp.
$Y_{X/glc}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchter Glucose	0,413	$10^9$ Zellen $\text{mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{X/gln}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchtem Glutamin	0,573	$10^9$ Zellen $\text{mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{lac/glc}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Lactat zu verbrauchter Glucose	1,391	$\text{mmol mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{amm/gln}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Ammonium zu verbrauchtem Glutamin	0,739	$\text{mmol mmol}^{-1}$	Exp.
$Q_{mAb}$	Spezifische Produktbildungsrate	2,25	$10^{-12}$ $\text{g}_P$ $\text{Zelle}^{-1} \text{h}^{-1}$	Exp.
$r_{amm}$	Abbaurrate Ammonium	6,3	$10^{-12}$ $\text{mmol Zelle}^{-1} \text{h}^{-1}$	Lit.
$m_{glc}$	Koeffizient Erhaltungsstoffwechsel Glucose	69,2	$10^{-12}$ $\text{mmol Zelle}^{-1} \text{h}^{-1}$	Lit.
$a_1$	Koeffizient für $m_{gln}$	3,2	$10^{-12}$ $\text{mmol Zelle}^{-1} \text{h}^{-1}$	Lit.
$a_2$	Koeffizient für $m_{gln}$	2,1	mM	Lit.
$K_{glc}$	Monod-Konstante Glucose	0,15	mM	Lit.
$K_{gln}$	Monod-Konstante Glutamin	0,04	mM	Lit.
$K_{llac}$	Monod-Konstante Lactat für Inhibierung	45,0	mM	Lit.
$K_{lamm}$	Monod-Konstante Ammonium für Inhibierung	9,5	mM	Lit.
$K_{Dlac}$	Monod-Konstante Lactat für Sterbephase	40,0	mM	Lit.
$K_{Damm}$	Monod-Konstante Ammonium für Sterbephase	4,0	mM	Lit.

Abbildung 17 zeigt den Verlauf der Modellvariablen der viablen Zellzahl-, Antikörper-, Glucose-, Lactat- und Ammoniumkonzentration im Vergleich zu experimentellen Prozessvariablen basierend auf drei Fed-Batch Kultivierungen. Zusätzlich ist beispielhaft der Verlauf der Trübung einer Fed-Batch Kultivierung gezeigt, die die jeweiligen Zufütterungszeitpunkte inklusive die aus der Zufütterung resultierende Abnahme der Variablenkonzentration (Verdünnung) verdeutlicht.



**Abbildung 17:** Verlauf der Modellvariablen (rot) der viablen Zellzahl-, Antikörper-, Glucose-, Lactat- und Ammoniumkonzentration im Vergleich zu den experimentellen Prozessvariablen (schwarz). Die Fehlerbalken repräsentieren die experimentelle offline Bestimmung der Prozessvariablen von drei Fed-Batch Kultivierungen.

Quantitativ kann das Prozessmodell mit den experimentellen Daten mit Hilfe linearer Regressionen verifiziert werden. Abbildung 18 zeigt die lineare Regression der experimentell und modellbasierten viablen Zellzahl- ( $R^2 \geq 0,98$ ), Glucose- ( $R^2 \geq 0,97$ ), Antikörper- ( $R^2 \geq 0,99$ ) und Lactatkonzentration ( $R^2 \geq 0,92$ ). Das Prozessmodell kann die Prozessvariablen Antikörper- und viable Zellzahlkonzentration entsprechend der Anpassungsgüte der Regression ( $R^2$ ) beschreiben. Phänomene und deren jeweilige Einflüsse auf die Prozessvariablen, die das Prozessmodell nicht abbildet (zum Beispiel Aminosäuren-, und Vitaminstoffwechsel) resultieren in Differenzen zwischen den experimentellen und modellbasierten Daten. Die Detailgüte des Prozessmodells kann, wie in Tabelle 5 angedeutet, durch die Verwendung von metabolischen Netzwerken erhöht werden, wodurch Differenzen vermieden werden.

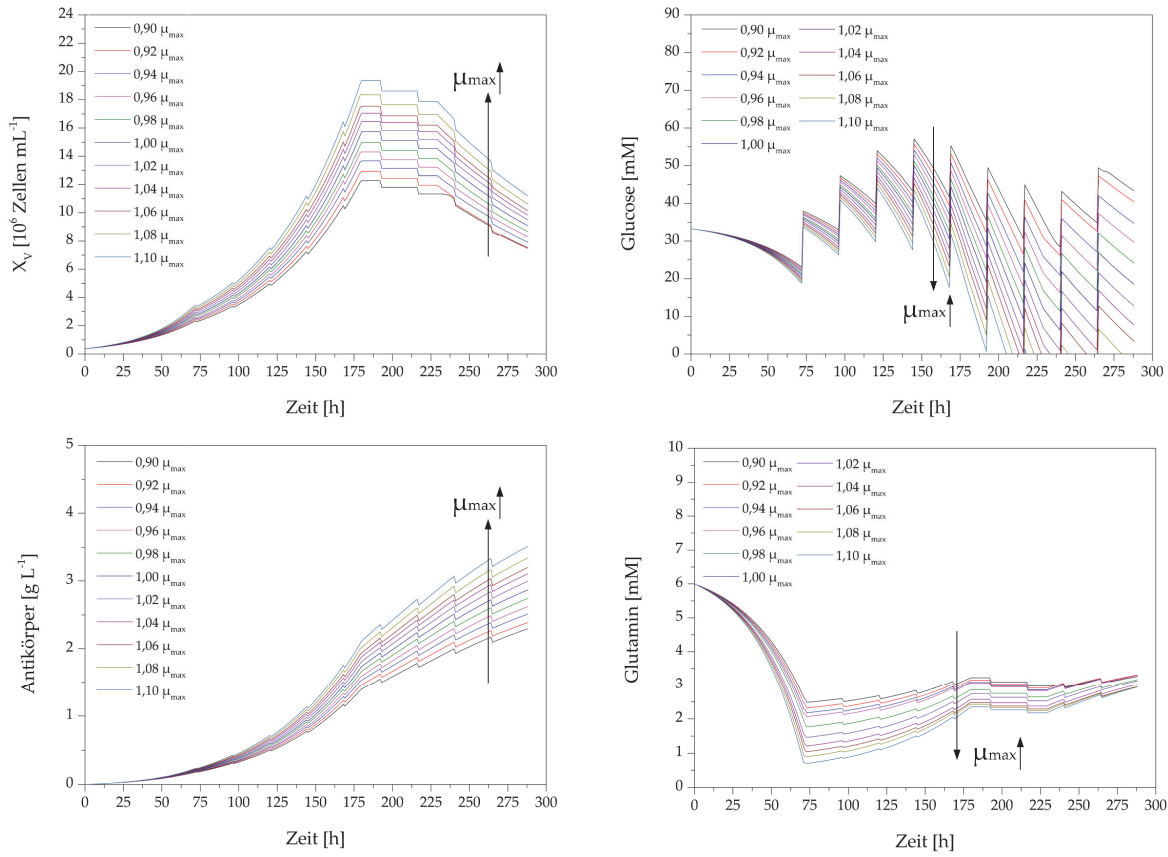


**Abbildung 18:** Lineare Regression der experimentell und modellbasierten viablen Zellzahl- ( $R^2 \geq 0,98$ ), Glucose- ( $R^2 \geq 0,97$ ), Antikörper- ( $R^2 \geq 0,99$ ) Lactatkonzentration ( $R^2 \geq 0,92$ ). Die Fehlerbalken repräsentieren die experimentelle offline Bestimmung der Prozessvariablen von drei Fed-Batch Kultivierungen.

Sensitivitätsanalysen wie die Veränderung eines Modellparameters (engl. one-parameter-at-a-time) oder statistischer Versuchsplanung (engl. Design of Experiments, DoE) sind essentiell, um den Einfluss der Modellparameter auf die Modellvariablen zu detektieren und grobe Modellfehler zu erfassen. Die Veränderung der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  ( $\pm 10 \% \mu_{\max}$ ) und deren Einfluss auf die Modellvariablen viable Zellzahl-, Antikörper-, Glucose- und Lactatkonzentration sind in Abbildung 19 zu sehen.

Höhere maximale Wachstumsraten  $\mu_{\max}$  resultieren in der exponentiellen Phase zwischen 72 h und 180 h zu einem höheren Ansteigen der viablen Zellzahlkonzentration. Dies ergibt sich aus einer höheren spezifischen, apparenten Wachstumsrate  $\mu$ , wie in Gleichung (4.1) und (4.2) zu sehen. Die maximale Wachstumsrate besitzt einen Einfluss auf das Wachstum und die maximale Zellzahlkonzentration innerhalb der exponentiellen Phase des makroskopischen Prozessmodells. Eine höhere Produktkonzentration als auch ein erhöhter Verbrauch an Glucose und Glutamin bei gleichbleibender Zufütterungsstrategie ist entsprechend der Erhöhung der Zellzahlkonzentration

durch die Variation von  $\mu_{\max}$  zu beobachten, die basierend auf den Gleichungen (4.4) und (4.6) von der aktuellen viablen Zellzahlkonzentration abhängt.



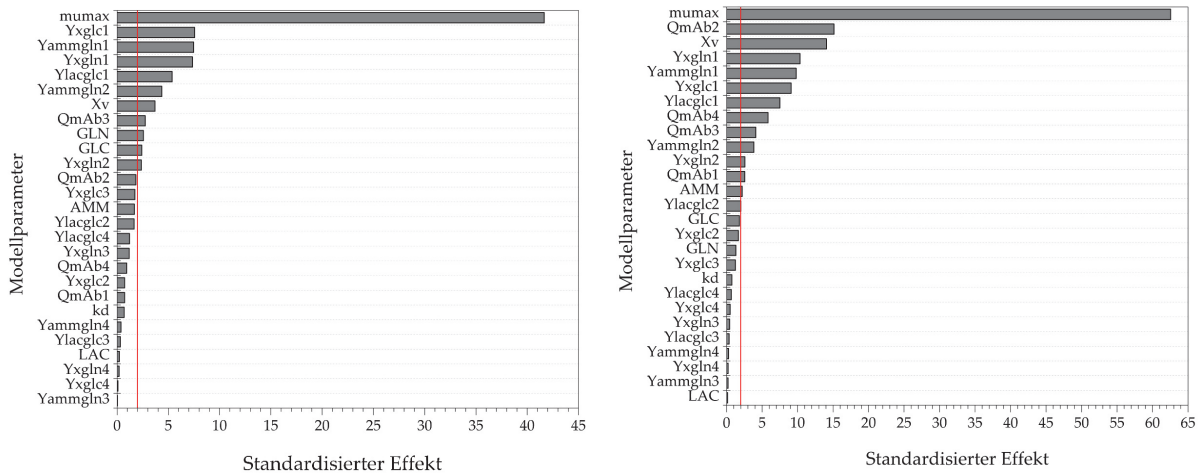
**Abbildung 19:** Variation der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  ( $\pm 10 \% \mu_{\max}$ ) und deren Einfluss auf die Modellvariablen.

Die maximale Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  besitzt den signifikantesten Einfluss auf den Verlauf der Modellvariablen während den Einzelvariationen der Modellparameter, da die viable Zellzahlkonzentration und somit die Wachstumsrate  $\mu$ , die Substrat-, Metabolit- und Produktkonzentration beeinflusst. Eine präzise experimentelle Bestimmung der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  mit Hilfe von beispielsweise Trübungssonden oder der Raman-Spektroskopie ist somit essentiell für eine präzise Modellierung des dynamischen Verhaltens der Zellkultur.

Eine quantitative Analyse der signifikanten Modellparameter kann mit Hilfe von DoE-Studien durchgeführt werden. Zusätzlich werden Interaktionen zwischen mehreren Parametern durch die gleichzeitige Veränderung der Modellparameter detektiert. Hierfür wurde mit den Modellparametern ein teilfaktorieller Versuchsplan mit 128 Simulationen (Auflösung IV) erstellt und durchgeführt. In Abbildung 20 ist das Paretodigramm zu erkennen, welches die



Modellparameter nach ihrer Signifikanz basierend auf einem Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) von 0,05 auf die Modellvariablen maximale viable Zellzahlkonzentration und maximale Produktkonzentration absteigend auflistet.



**Abbildung 20:** Paretodiagramm der standardisierten Effekte für die einzelnen Modellparameter basierend auf deren Einfluss auf die Modellvariablen maximale viable Zellzahlkonzentration (links) und maximale Antikörperkonzentration (rechts). Die vertikale, rote Linie repräsentiert die Referenzlinie für die statistische Signifikanz (hier jeweils 1,98 für beide Modellvariablen). Das Signifikanzniveau  $\alpha$  beträgt 0,05. 1, Lag-Phase; 2, exponentielle Phase; 3, stationäre Phase; 4, Sterbephase.

Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{x/glc}$  besitzt neben der maximalen Wachstumsrate einen signifikanten Einfluss auf die maximale viable Zellzahlkonzentration (Abbildung 20, links).  $Y_{x/glc}$  beschreibt das Verhältnis zwischen der Zunahme der viablen Zellzahlkonzentration ( $10^6$  Zellen  $mL^{-1}$ ) und des gleichzeitigen Verbrauchs an Glucose (mM). Ein höheres  $Y_{x/glc}$  resultiert in einem effizienteren Verbrauch des Substrats und führt dementsprechend zu höheren Zellzahlkonzentrationen, wie in Gleichung (4.4) gezeigt. Diese Korrelation ist, wie in Gleichung (4.6) zu sehen, analog für  $Y_{x/gln}$ .

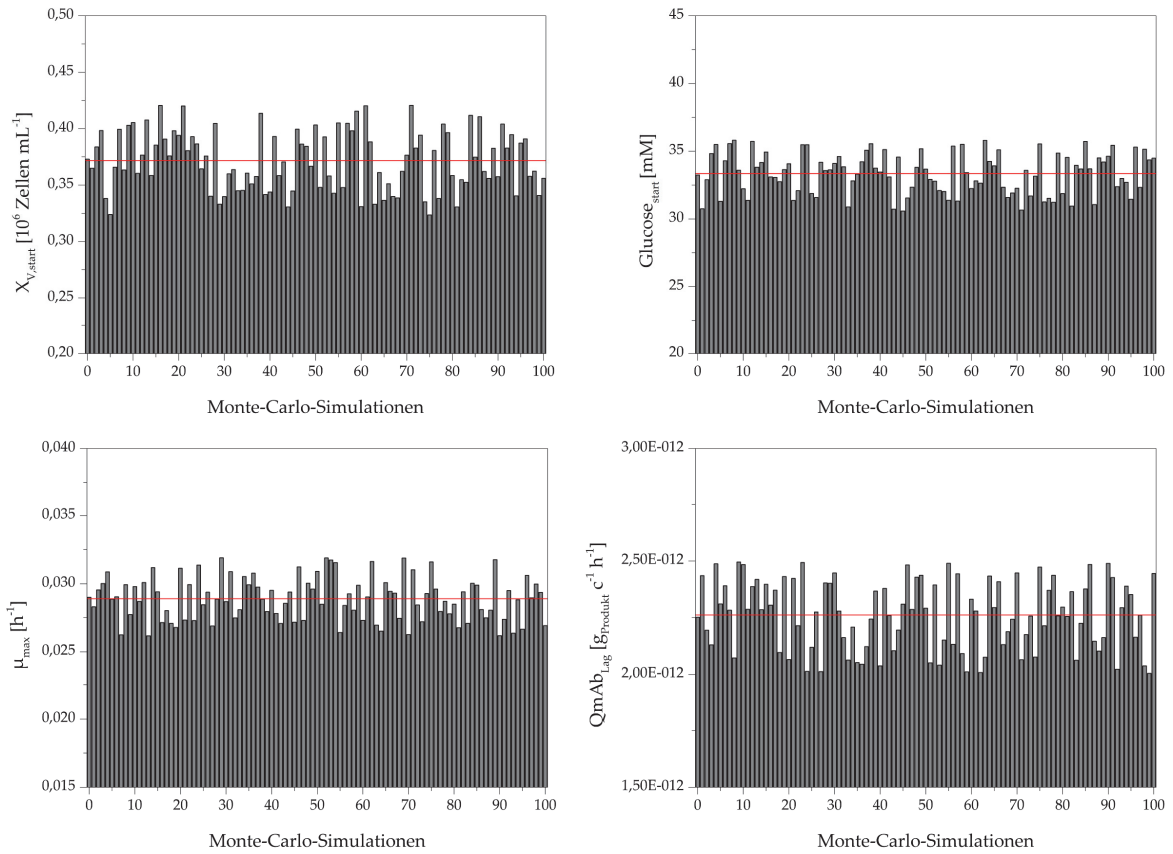
Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{lac/glc}$ , der das Verhältnis zwischen der Zunahme der Lactatkonzentration (mM) und des gleichzeitigen Verbrauchs an Glucose (mM) beschreibt, wird in dem Paretodiagramm in Abbildung 20 als signifikant dargestellt. Ein höheres  $Y_{lac/glc}$  resultiert in einer höheren Lactatkonzentration und demnach in einer stärkeren Inhibierung der Wachstumsrate  $\mu$  und letztlich zu einer reduzierten maximalen viablen Zellzahlkonzentration (Gleichung (4.5)). Diese Korrelation ist, wie in Gleichung (4.8) zu sehen, analog für  $Y_{amm/gln}$ .

Der initiale Wert für die viable Zellzahlkonzentration ( $X_v$ , Inokulum) besitzt ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die maximale viable Zellzahlkonzentration. Höhere Werte des Inokulums bedingen jedoch ein Ansteigen des Substratverbrauchs und der Metabolitproduktion, wodurch die Wachstumsrate  $\mu$  und dadurch die viable Zellzahlkonzentration reduziert wird.

Die maximale Sterberate  $k_d$  besitzt keinen signifikanten Einfluss auf die maximal erreichbare viable Zellzahlkonzentration, da dieser Modellparameter, wie in Gleichung (4.3) zu sehen, von der derzeitigen Lactat- und Ammoniumkonzentration abhängt. Höhere Metabolitkonzentrationen resultieren in einem Ansteigen der Sterberate  $\mu_d$  und letztlich in einer geringeren maximalen Zellzahlkonzentration. Diese Metabolite akkumulieren während der Fed-Batch Kultivierung und besitzen aufgrund ihrer ansteigenden Konzentration vor allem in der Sterbephase der Kultur einen Einfluss auf die viable Zellzahlkonzentration, nachdem die maximal erreichbare Zellzahlkonzentration bereits überschritten wurde. Nichtsdestotrotz besitzt  $k_d$  einen Einfluss auf die betrachte Modellvariable, da die apparente Wachstumsrate ( $\mu$  minus  $\mu_d$ ) von der maximalen Sterberate beeinflusst wird.

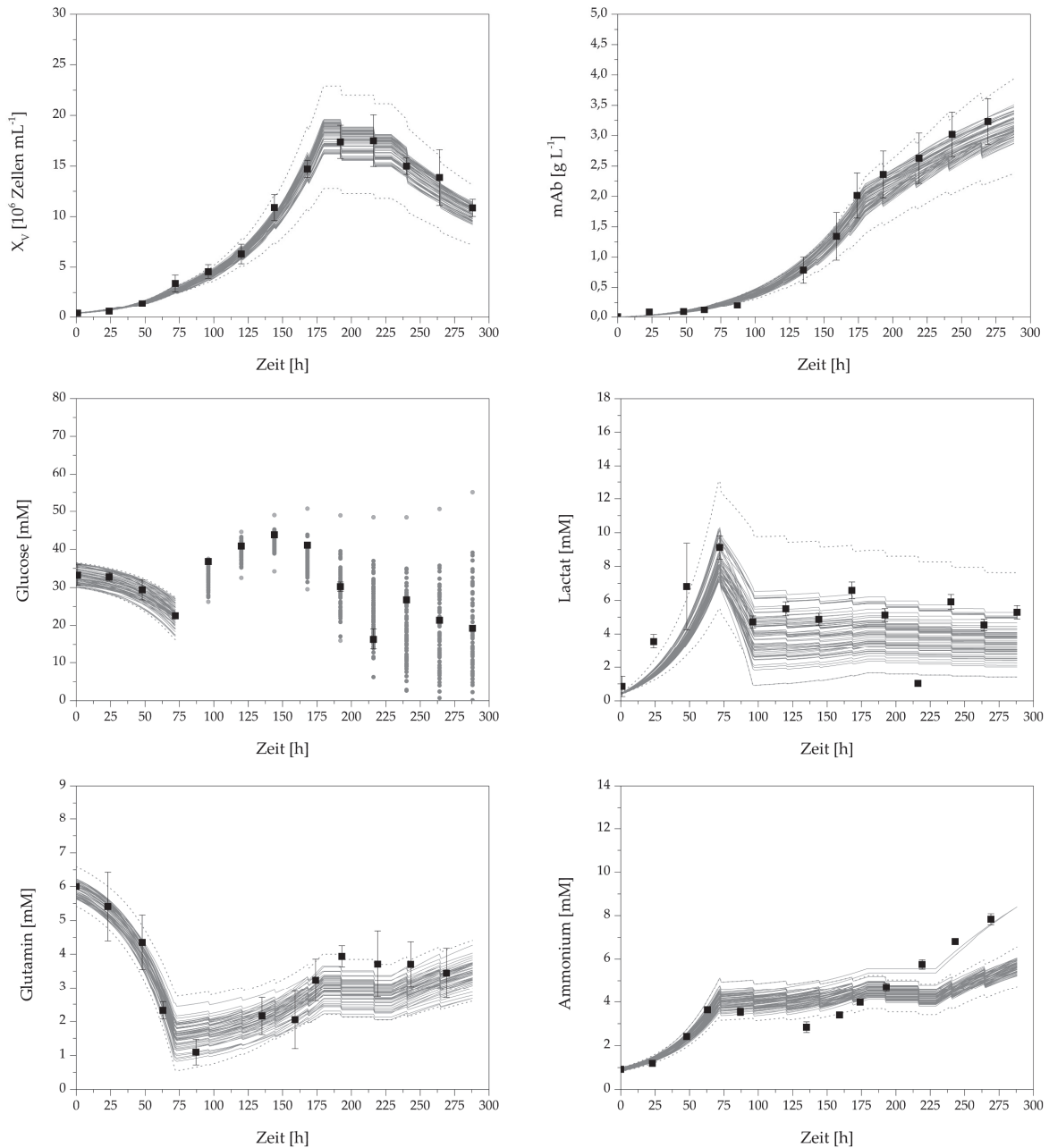
Ähnliche Beobachtungen können in Abbildung 20 (rechts) für die Modellvariable maximale Antikörperkonzentration ( $mAb_{max}$ ) gefunden werden. Zusätzlich zu den zuvor genannten Korrelationen, besitzt die zellspezifische Antikörperproduktionsrate  $Q_{mAb}$  einen signifikanten Einfluss auf die maximale Produktkonzentration. Die spezifische maximale Wachstumsrate  $\mu_{max}$  scheint jedoch der signifikanteste Modellparameter zu sein, wie in Abbildung 20 und in vorherigen Sensitivitätsanalysen in Abbildung 19 zu erkennen.

Die Präzision des Prozessmodells kann durch den Einfluss des fortgepflanzten Fehlers der experimentellen Modellparameterbestimmung auf das Modellergebnis quantitativ beurteilt werden. Diese Modellparameterfehler repräsentieren maximale und minimale Werte für jeden Modellparameter. Diese Varianz kann in eine Monte-Carlo-Simulation integriert werden, um den Einfluss der Fehler auf das Prozessmodell zu charakterisieren. Die aus der Monte-Carlo-Simulation gleichverteilten Werte der Modellparameter innerhalb des jeweiligen Fehlers der Parameterbestimmung sind in Abbildung 21 zu sehen. Der arithmetische Mittelwert jedes Parameters in Abbildung 21 wird durch eine horizontale rote Linie gekennzeichnet, die dem jeweiligen Wert aus Tabelle 12 entspricht (zum Beispiel  $0,029 \text{ h}^{-1} \mu_{max}$ ). Diese Analyse ist in der Lage den Einfluss des Modellparameterfehlers und dessen Interaktionen zwischen den jeweiligen Parametern auf das makroskopisch kinetische Prozessmodell darzustellen.



**Abbildung 21:** Beispiele der gleichverteilten Modellparameter, die aus 100 Monte-Carlo-Simulationen resultieren, bei denen jeder Parameter innerhalb des jeweiligen experimentellen Parameterfehlers variiert wurde. Die horizontale rote Linie repräsentiert den arithmetischen Mittelwert jedes Parameters.

Die 100 Monte-Carlo-Simulationen resultieren in minimale und maximale Werte für jede Modellvariable, welche mit Hilfe von Umhüllungskurven (Standardabweichung der Simulationsergebnisse) gekennzeichnet werden können (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Umhüllungskurven für jede Prozessvariable basierend auf 100 Monte-Carlo-Simulationen durch die Variation der Modellparameter innerhalb ihrer Modellparameterfehler. Die schwarzen Quadrate und Fehlerbalken repräsentieren die experimentelle Dreifachbestimmung der jeweiligen Prozessvariable. Für eine bessere Übersichtlichkeit und Visualisierung wurde die Umhüllungskurve für Glucose nach 72 h Kultivierung als Konzentrationswerte vor der jeweiligen Zufütterung dargestellt. Der detaillierte Verlauf der Glucosekonzentration zwischen den Zufütterungen ist in Abbildung 19 zu sehen.

Zusätzlich zu den Umhüllungskurven, welche durch die grauen Linien in Abbildung 22 gekennzeichnet sind, ist das Prozessmodell in der Lage Parametervariationen abzubilden, die mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit auftreten (Simulationsergebnis ist kleiner/größer als die

Standardabweichung der mittleren Ergebnisse). Diese Grenzfälle werden durch gepunktete graue Linien dargestellt.

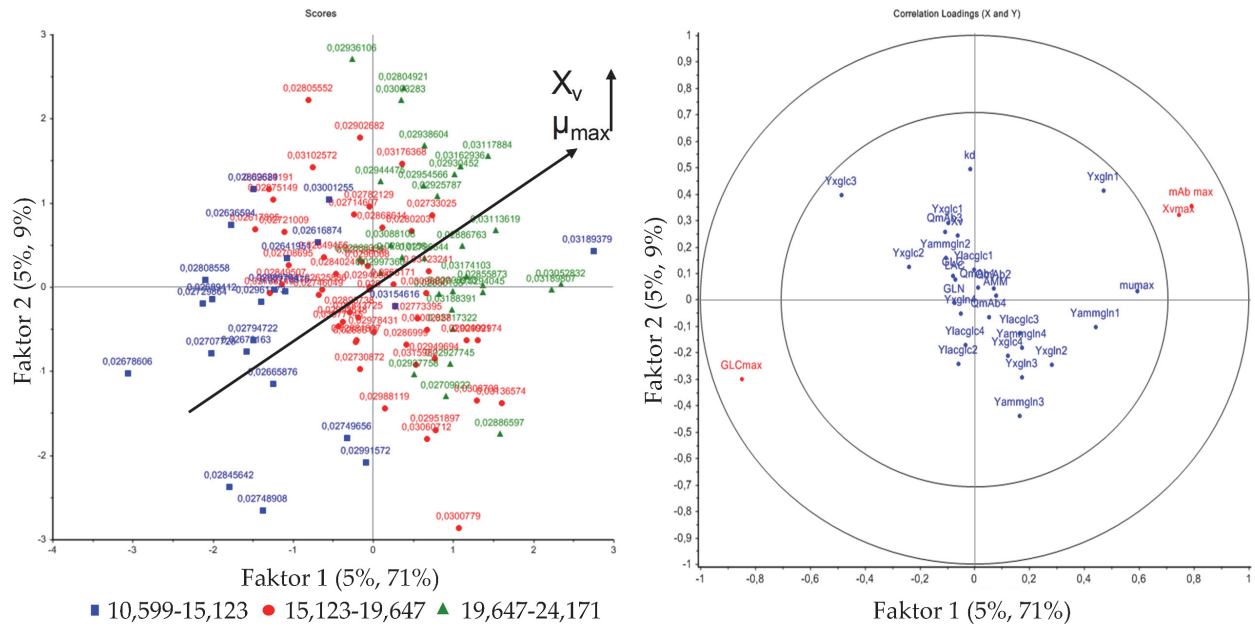
Maximale viable Zellzahlkonzentrationen erhöhen die Substrataufnahme und den Substratverbrauch, was zu einer schnelleren Verarmung von Glucose und Glutamin führt. Die Lactat-, Ammonium- und Antikörperkonzentration steigt ebenfalls mit höheren viablen Zellzahlkonzentrationen. Der signifikanteste Modellparameter des makroskopisch kinetischen Modells ist die maximale Wachstumsrate  $\mu_{\max}$ , da Variationen dieses Parameters das Modellergebnis signifikant beeinflussen, wie bereits in den Signifikanzanalysen in Abbildung 19 und dem Paretdiagramm in Abbildung 20 zu erkennen.

Die Korrelation zwischen Prädiktoren (zum Beispiel Prozessparameter wie  $\mu_{\max}$ ) und Antworten (zum Beispiel Prozessvariablen wie  $X_{V,\max}$ ) können mit Hilfe der Regression der partiellen kleinsten Quadrate (PLS) statistisch evaluiert werden. Als Datengrundlage dienen die Ergebnisse der 100 Monte-Carlo-Simulationen, wie exemplarisch in Tabelle 13 gezeigt.

**Tabelle 13:** Exemplarische Darstellung der Datengrundlage für die PLS-Regression. Prozessparameter ( $X_{V,\min}$ ) und Zielvariable ( $X_{V,\max}$ ) resultieren aus 100 Monte-Carlo-Simulationen.

Parametersatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	.....
$X_{V,\min}$ [10 <sup>6</sup> Zellen mL <sup>-1</sup> ]	0,37	0,32	0,42	0,36	0,38	0,40	0,34	0,32	0,37	.....
$X_{V,\max}$ [10 <sup>6</sup> Zellen mL <sup>-1</sup> ]	17,01	10,60	24,17	20,13	19,74	15,06	19,50	19,84	19,28	.....

Abbildung 23 zeigt die PLS-Regression des Einflusses der Variation der Modellparameter auf die maximale viable Zellzahl-, Glucose- und Antikörperkonzentration. Die maximale Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  korreliert positiv zu der maximalen viablen Zellzahlkonzentration  $X_{V,\max}$  und negativ zu der maximalen Glucosekonzentration  $GLC_{\max}$ . Wie bereits in den Sensitivitätsanalysen in Abbildung 19 zu sehen, werden für  $X_{V,\max}$  höhere Werte durch höhere maximale Wachstumsraten  $\mu_{\max}$  erreicht.



**Abbildung 23:** Wertung (links) und Gewichtung (rechts) der PLS-Regression für die maximale viable Zellzahlkonzentration  $X_{V,max}$ , maximale Antikörperkonzentration  $mAb_{max}$  und maximale Glucosekonzentration  $GLC_{max}$  als Antwort (Modellergebnis, rot) basierend auf dem Einfluss der Prädiktoren (Modellparameter, blau). Die Ergebnisse der Wertung der PLS-Regression (links) sind nach  $X_{V,max}$  gruppiert, um den Einfluss von  $\mu_{max}$  (Zahlenwerte) zu visualisieren.

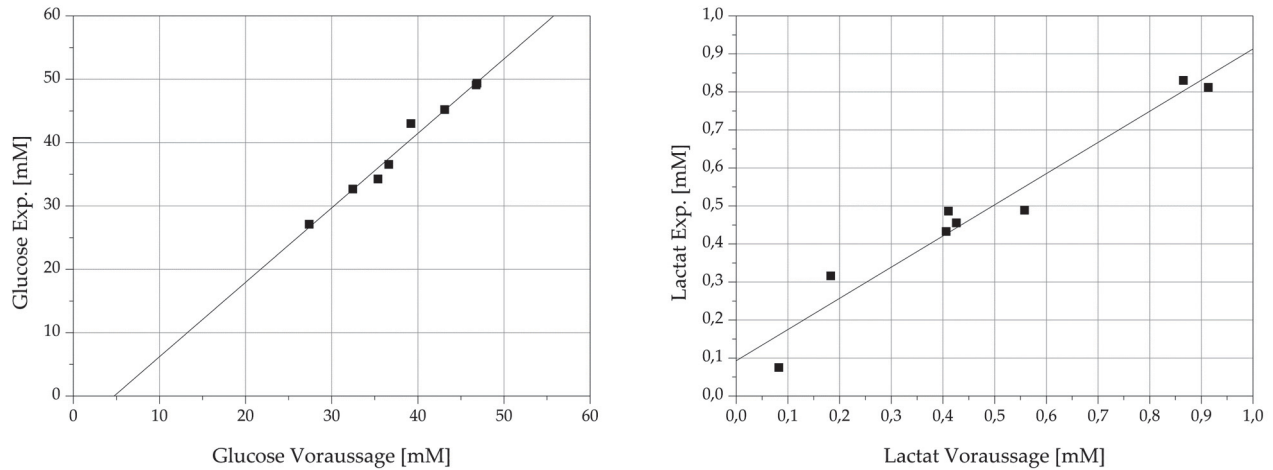
Die höheren Zellzahlkonzentrationen verursachen einen erhöhten Substratverbrauch, wodurch die negative Korrelation zwischen  $\mu_{max}$  und  $GLC_{max}$  erklärbar ist. Die Wertung der PLS-Regression (Abbildung 23 links) identifiziert Probenmuster durch die Gruppierung der Antworten ( $X_{V,max}$ ) und der Kennzeichnung der Prädiktoren ( $\mu_{max}$ ). Höhere Wachstumsraten verursachen höhere Zellzahl- und Antikörperkonzentrationen, wie in der Abbildung 19 und den Gleichungen (4.1) und (4.9) zu sehen ist.

Sensortechniken wie Trübungssonden (limitiert durch die Zellviabilität) oder der Raman-Spektroskopie (limitiert durch das chemometrische Modell), die während der Kultivierung eingesetzt werden können, unterstützen die präzise Bestimmung der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{max}$  durch die online Beobachtung der Zellzahlkonzentration und erhöhen die Datenmenge, den Zuwachs an Prozessinformation und dadurch die Genauigkeit und Präzision des Prozessmodells.

#### 4.1.3. Kombination der experimentellen Daten mit dem Prozessmodell

Online Trübungsdaten, die entsprechend deren Limitation die viable Zellzahlkonzentration repräsentieren (Abbildung 6) können in das makroskopisch kinetische Prozessmodell integriert werden, um Modell- beziehungsweise Prozessvariablen zu bestimmen, die sonst nur offline zugänglich wären. In Abbildung 24 sind die Glucose- und Lactatkonzentrationen gezeigt, die auf der

Integration der online gemessenen viablen Zellzahlkonzentration mittels *in-situ* Trübungssonden in das Prozessmodell basieren.



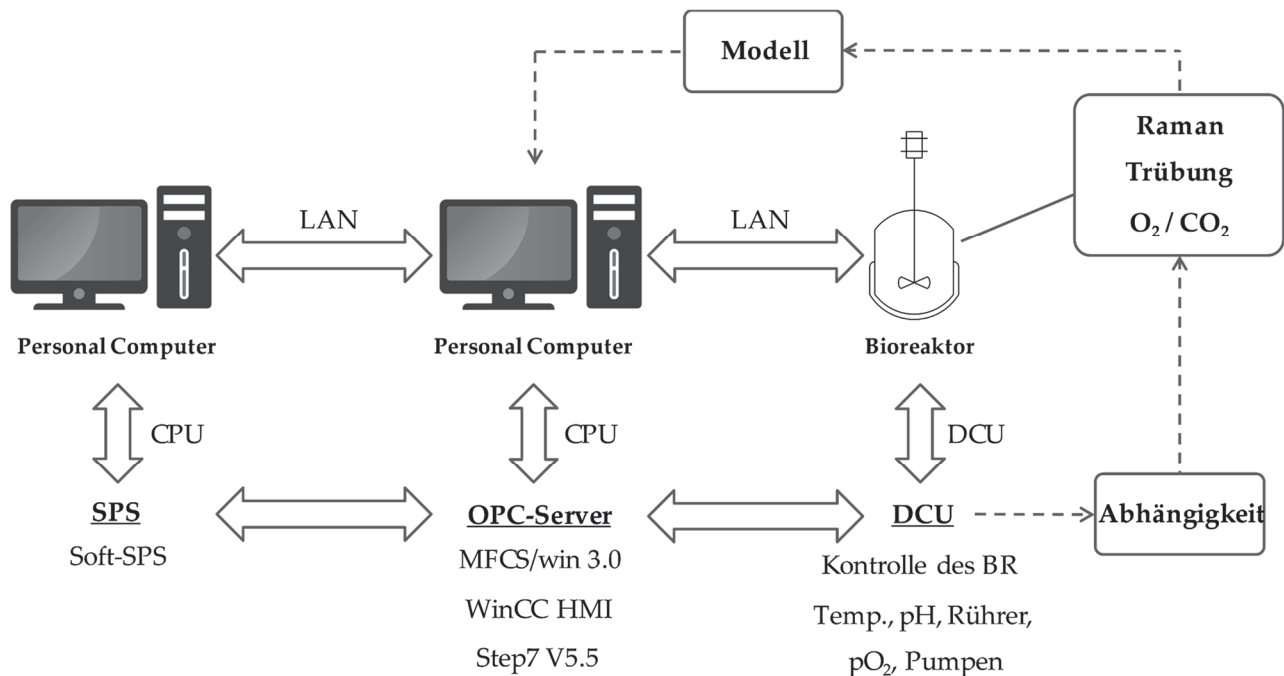
**Abbildung 24:** Lineare Regression der offline gemessenen Glucose- (links) als auch Lactatkonzentrationen (rechts) mit der Voraussage der jeweiligen Prozessvariable durch die Integration der online gemessenen Trübung in das Prozessmodell. Die Fehlerbalken repräsentieren die experimentelle Zweifachbestimmung der Prozessvariablen.

Das Prozessmodell ist in der Lage die offline gemessene Glucosekonzentration mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 \geq 0,96$  vorauszusagen. Die Vorhersage der Glucosekonzentration während der Fed-Batch-Phase (ab 72 h Kultivierung) ist herausfordernd, da physiologische Effekte der Feed-Medien, wie der Einfluss weiterer Medienkomponenten auf den zellulären Zustand der Kultivierung, nicht durch das Prozessmodell beschrieben werden. Des Weiteren resultiert jede Prozessschwankung in eine nicht beschriebene Nichtidealität des zellulären Zustands oder der Substratkonzentration. Zusätzlich ist die Güte der Vorhersage abhängig von der Zellviabilität und der Genauigkeit der Trübungsdaten, wie im Kapitel 4.1.1 bereits gezeigt wurde.

Das Prozessmodell ist zusätzlich fähig neben der Substratkonzentration die Metabolitkonzentration vorauszusagen. In Abbildung 24 (rechts) ist die lineare Regression der Voraussage und der offline gemessenen Lactatkonzentration mit einem  $R^2 \geq 0,90$  zu sehen.

Diese Erkenntnisse können für die Prozessentwicklung hinsichtlich Fütterungsstrategien eingesetzt werden, um die Zeitpunkte der Zufütterung basierend auf der aktuellen Substratkonzentration online zu bestimmen. Eine Erweiterung des Prozessmodells durch beispielsweise Aminosäuren oder den Einsatz eines metabolischen Netzwerks, welches das zelluläre Wachstum detaillierter betrachtet, würde die spezifische Produktivität steigern und eine hohe Produktqualität aufrechterhalten [Chee Fung Wong 2005].

In Abbildung 25 ist schematisch eine mögliche Prozessstruktur gezeigt, die die Kombination der experimentellen Daten mit dem makroskopischen Modell verwendet, um die Prozessparameter und letztlich die Prozessvariablen zu regeln.



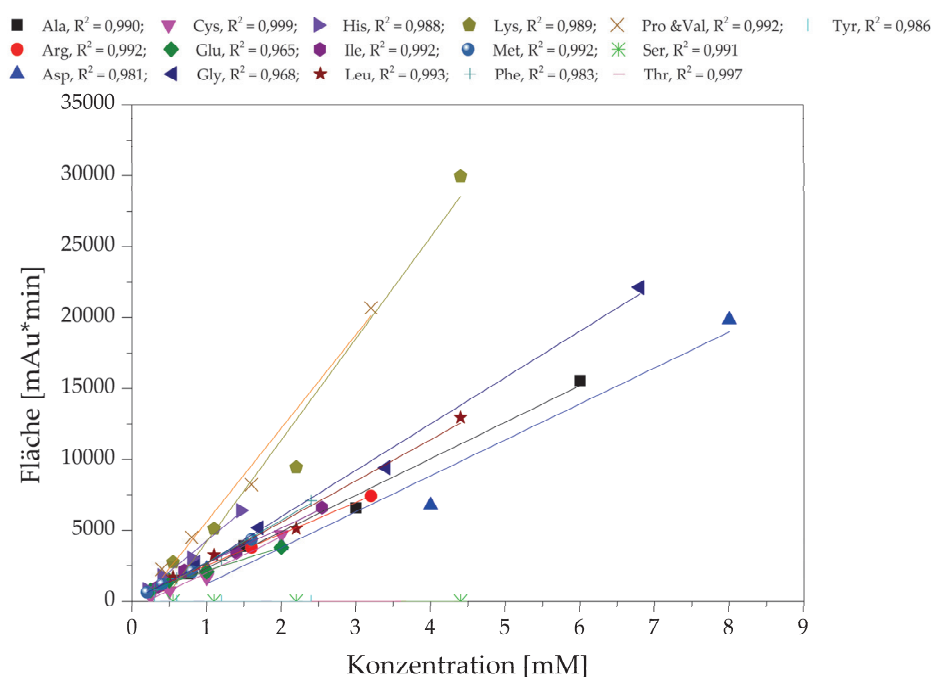
**Abbildung 25:** Schematische Prozessstruktur zur Regelung der durch die Kombination der experimentellen Daten mit dem makroskopischen Modell vorausgesagten Prozessvariablen. Die Struktur basiert auf einer speicherprogrammierbaren Steuerung (SPS), die über einen OPC-Server (engl. Open Platform Communications) mit dem Bioreaktor und dessen DCU (Digital Control Unit) verbunden ist.



## 4.2. USP-DSP-Integration

### 4.2.1. Einfluss der Medienkomponenten auf die Produktivität

Die Analyse der kommerziellen Medien ist eine komplexe Trennaufgabe, da die Medien Lösungen aus einer Vielzahl an Komponenten wie Aminosäuren, Vitamine, Lipide, Hormone, Wachstumsfaktoren und Salzen darstellen [Gstraunthaler 2013]. Aus diesem Grund liegt der Fokus zunächst auf der Analyse der Aminosäuren der eingesetzten Medien. Es ist essentiell, dass die Linearität der Kalibriergeraden der Standards mit einem hohen Bestimmtheitsmaß gegeben ist, damit diese zur Berechnung der Konzentrationen verwendet werden können. In Abbildung 26 sind die Kalibriergeraden und das jeweilige Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der linearen Regressionen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Kalibriergeraden geeignet sind die Konzentrationen der Aminosäuren in den Medien zu bestimmen.

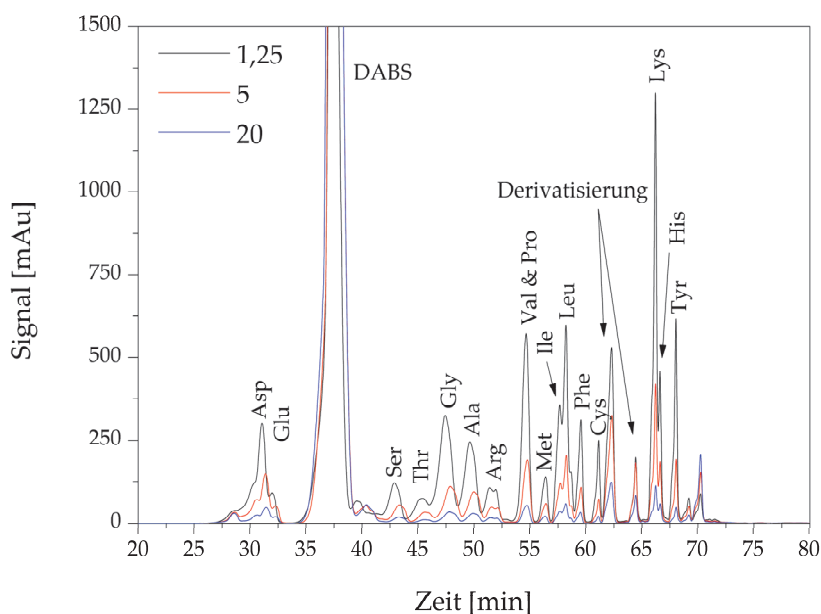


**Abbildung 26:** Validierung der Linearität des Kombinationsstandards inklusive der Bestimmtheitsmaße.

Die Aminosäuren Valin und Prolin können nur gemeinsam bestimmt werden, da beide Aminosäuren bei den Einzelstandards circa die gleiche Retentionszeit besitzen. Im Kombinationsstandard können diese zwar über das eingesetzte Verhältnis bestimmt werden, aber für die Analyse der Konzentrationen im Medium ist das nicht möglich, da deren Verhältnis unbekannt ist. Aus diesem Grund werden beide Signalfächen zu einer zusammengefasst. Des

Weiteren sind Glutamin und Tryptophan nicht eindeutig zu bestimmen, da das Derivatisierungsgagens diese Komponenten wahrscheinlich überlagert.

In Abbildung 27 ist das Chromatogramm des Kombinationsstandards dargestellt. Die Signale der Derivatisierung sind diejenigen, die ebenfalls bei einer einzelnen Messung der Dabsylchloridlösung detektiert werden.



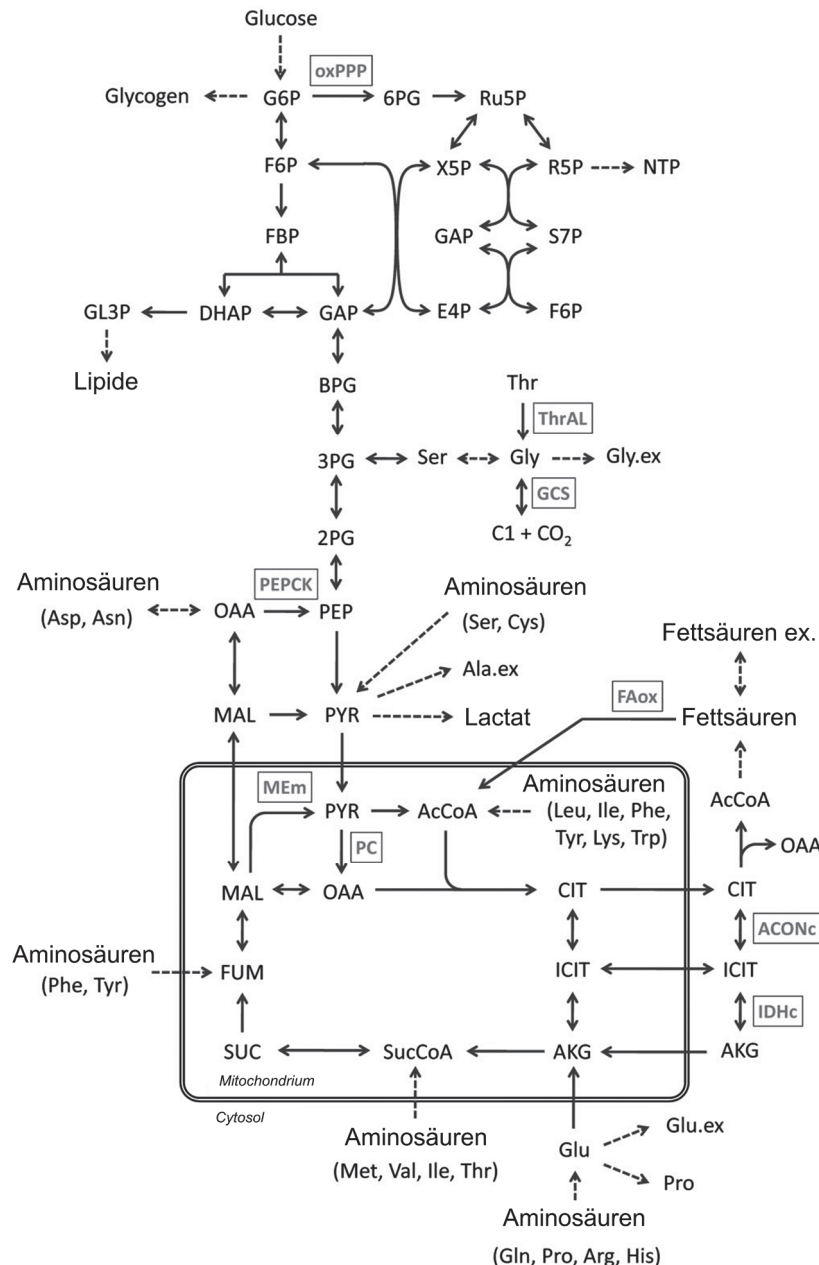
**Abbildung 27:** Chromatogramm des Kombinationsstandards in drei Verdünnungen (1,25; 5; 20).

Die Ergebnisse der Konzentrationsmessung sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Feed Medium B besitzt einen basischen pH-Wert, welcher zur Lösung und Stabilität einiger Komponenten, wie Tyrosin oder Vitamine wie beispielsweise Folsäure (Vitamin B<sub>9</sub>) und Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) notwendig ist. Tyrosin konnte sich in größeren Mengen erst nach langem Rühren bei einem pH-Wert von 11 lösen. Aus diesem Grund ist Tyrosin in den Medien PM und FMA geringer vorhanden. Der stark basische pH-Wert und die hohen Konzentrationen der Aminosäuren in FMB erklären die geringe Zugabe dieses Mediums während der Zufütterung.

**Tabelle 14:** Gemessene Konzentrationen der kommerziellen Kultivierungsmedien. PM, Produktionsmedium; FMA, Zufütterungsmedium A; FMB, Zufütterungsmedium B.

Aminosäuren	PM [mg L <sup>-1</sup> ]	FMA [mg L <sup>-1</sup> ]	FMB [mg L <sup>-1</sup> ]
Asparagin	632,9	472,2	-
Glutaminsäure	234,5	484,2	-
Serin	694,0	2259,9	1892,5
Threonin	548,2	678,5	-
Glycin	387,9	240,7	-
Alanin	330,2	567,0	2154,3
Arginin	292,7	476,3	81,6
Prolin & Valin	1168,9	3011,6	-
Methionin	319,4	669,5	-
Isoleucin	645,9	1342,2	4307,2
Leucin	785,7	1458,7	71,9
Phenylalanin	446,8	1246,0	-
Cystein	608,2	387,9	492,9
Lysin	572,7	716,5	-
Histidin	270,2	302,8	-
Tyrosin	287,72	54,8	2655,6

Die Auswahl der Aminosäuren für die statistische Evaluierung des Einflusses der Aminosäuren auf die Produktbildung stützt sich auf Erkenntnissen aus der Literatur und den ermittelten Konzentrationen der eingesetzten Medien. Dabei soll der Fokus auf den Aminosäuren und deren Wechselwirkungen untereinander liegen. Da die Medien allerdings aus weit mehr Komponenten bestehen, kann das Medium nicht von Grund auf neu zusammengesetzt werden. Aufgrund der fehlenden Komponenten wird das bisher verwendete Medium deshalb durch bestimmte Aminosäuren erweitert, sodass diese in höheren Konzentrationen vorliegen. Das Ziel dieser Versuchsreihe ist es, die Effekte der ausgewählten Aminosäuren auf die Antikörperproduktion während der Kultivierung der CHO Zellen zu ermitteln. Die Auswahl der relevanten Aminosäuren basiert auf dem metabolischen Netzwerk in Abbildung 28.



**Abbildung 28:** Metabolisches Netzwerk für CHO nach Ahn [2011].

Die Vorgehensweise stützt sich auf der Überlegung der Zelle eine Vielzahl an Energiequellen zur Verfügung zu stellen. Der zentrale Punkt des Energiemetabolismus und Ansatzpunkt für die kommenden Versuche ist der Citratzyklus. In der Literatur wird vermutet, dass Enzyme, die die Verknüpfung zwischen Glykolyse und Citratzyklus herstellen, in den kontinuierlichen Säugetierzellen fehlen oder eine geringe Aktivität besitzen [Glacken 1988].

Aus diesem Grund soll der Zelle Energie zur Verfügung gestellt werden, die nicht über den metabolischen Weg der Glucose eingeschleust wird. Die gestrichelten Pfeile in Abbildung 28 weisen auf die Stellen im Citratzyklus hin, an denen Aminosäuren nach dem Abbau zu Acetyl-CoA

(AcCoA), Fumarat (FUM) oder Succinyl-CoA (SucCoA) in den Zyklus eintreten. Eine weitere Eintrittsstelle ist über das  $\alpha$ -Ketoglutarat (AKG) möglich. Aus jeder der vier alternativen Eintrittsstellen ist jeweils eine Aminosäure ausgewählt worden. Dabei wurden die Aminosäuren ausgewählt, die laut der Aminosäureanalytik in geringer Konzentration im bisherigen Medium vorliegen. Es werden Glutamat (Glu), Histidin (His), Methionin (Met) und Tyrosin (Tyr) ausgewählt.

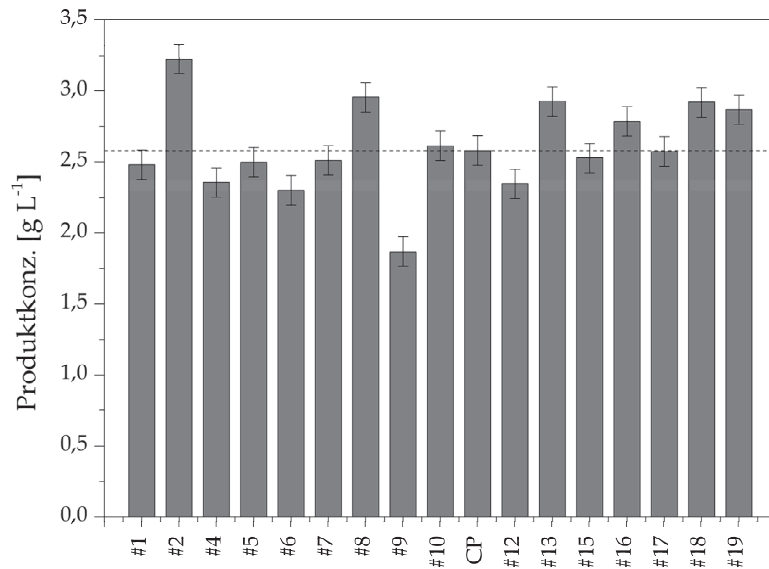
Die im Rahmen der statistischen Versuchsplanung durchgeführten Versuche sind in Bezug auf die Zielgröße Produktkonzentration untersucht worden. Dabei ist der Center Point in den Abbildungen das Mittel aus den drei durchgeführten Center Points (Wiederholungsversuchen) und wird mit deren Standardabweichung angegeben. Es wird davon ausgegangen, dass bei der statistischen Versuchsplanung die Streuung am Center Point repräsentativ für alle durchgeführten Versuche in der jeweiligen Versuchsreihe ist. In Tabelle 15 ist eine Übersicht der Versuche gegeben, welche die Zusammensetzung der Aminosäuren im Medium darstellt.

**Tabelle 15:** Übersicht aller Versuch mit dem Muster, welches die Zusammensetzung der Aminosäuren angibt. Plus bedeutet Zugabe, Minus bedeutet keine Zugabe und 0000 sind die Center Points in dreifacher Ausführung. Die Reihenfolge der Aminosäuren Glu, His, Met, Tyr stellt die Zugabe an Aminosäuren im Muster dar.

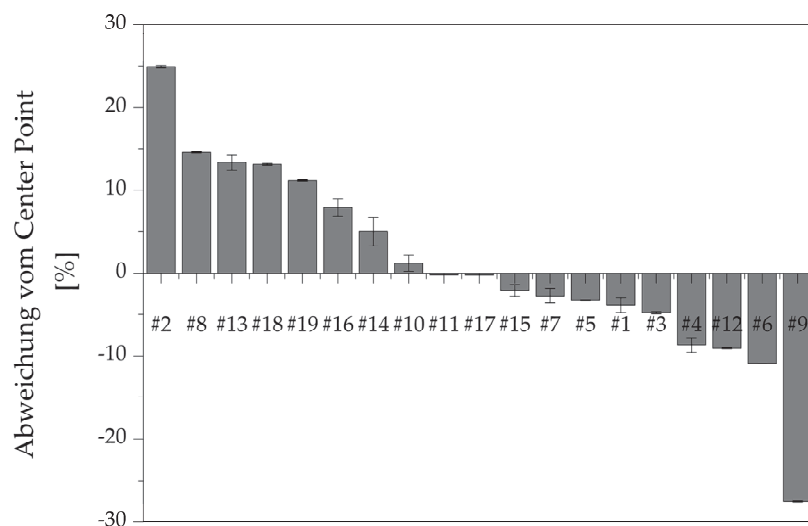
Versuch	Muster	Versuch	Muster
Nr.	[Glu,His,Met,Tyr]	Nr.	[Glu,His,Met,Tyr]
1	+++	11	0000
2	+--+	12	++++
3	0000	13	-++
4	++--	14	0000
5	--++	15	----
6	-+++	16	---+
7	-+-	17	++-
8	+--	18	-+-
9	+-+	19	--+
10	+-		

In Abbildung 29 ist eine Übersicht aller Versuche zu sehen. Die gestrichelte Linie markiert den arithmetischen Mittelpunkt des Center Points. Es ist zu erkennen, dass die Versuche 2, 8, 13, 16, 18 und 19 oberhalb des Mittelwerts liegen. Die prozentuale Abweichung der einzelnen Versuche vom

Center Point ist in Abbildung 30 angegeben. Versuch 2 liegt mit zirka 25 % über dem Mittelwert des Center Points, Versuch 9 hingegen um 27 % unterhalb.



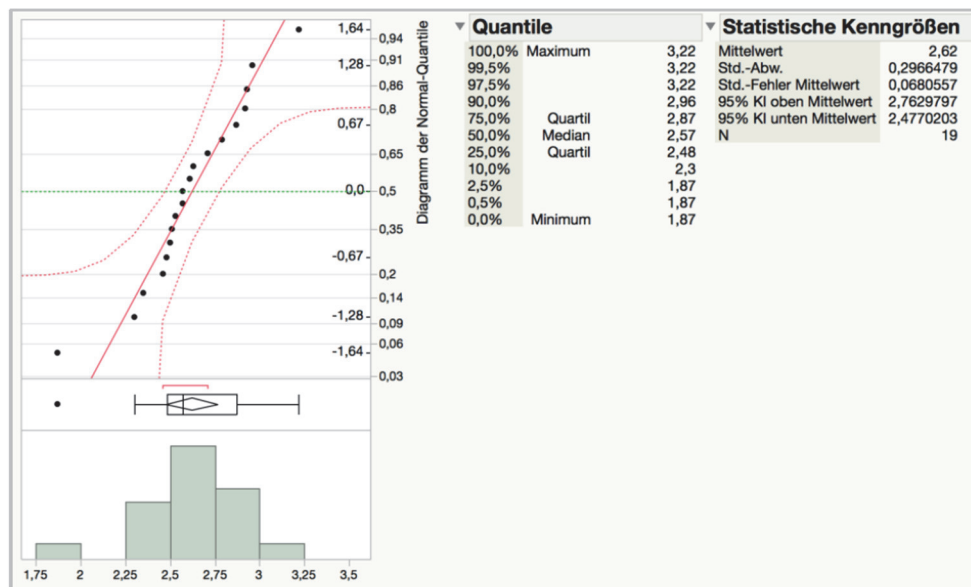
**Abbildung 29:** Übersicht der Produktkonzentration aller Versuche mit integriertem Center Point (CP). Die Gestrichelte Linie gibt den arithmetischen Mittelwert der drei Center Points an. Die Versuche 3, 11 und 14 sind die Center Points, welche unter Angabe der Standardabweichung, zusammengefasst sind.



**Abbildung 30:** Prozentuale Abweichung der Zielgröße Produktkonzentration vom Center Point.

Das Histogramm in Abbildung 31 weist nahezu eine Normalverteilung der Messwerte auf. Durch die Lücke wird deutlich, dass ein Experiment wesentlich schlechter ausgefallen ist als die restlichen Experimente. Das deutet auf eine signifikante negative Streuung hin. Der Box-Plot repräsentiert eine alternative Darstellung der Verteilung der Messwerte. Die Raute in der Mitte des Rechtecks beschreibt die Gesamtheit aller Messwerte. Die senkrechte Linie innerhalb des Rechtecks befindet sich bei normalverteilten Messwerten zentral in der Mitte. Die Ränder des Rechtecks geben die Lage der p-Quantile für p-Werte von 0,25 und 0,75 an. Die Abweichung in Abbildung 31 beschreibt, dass der Median ( $2,57 \text{ g L}^{-1}$ ) nicht mit dem arithmetischen Mittelwert ( $2,62 \text{ g L}^{-1}$ ) übereinstimmt. Somit ist die Verteilung der Messwerte nach links verschoben.

Die Visualisierung der Quantile stellt dar, welcher Anteil der Werte unter- beziehungsweise oberhalb des Medians liegt. Bei einer Übereinstimmung von Median und arithmetischem Mittelwert würden die Punkte idealerweise auf einer Geraden liegen. In Abbildung 31 ist zu sehen, dass dies näherungsweise erreicht wird. Die statistischen Kenngrößen auf der rechten Seite der Abbildung zeigen den arithmetischen Mittelwert über alle Versuche, die dazugehörige Standardabweichung und den Standardfehler des Mittelwertes. Darüber hinaus ist der Mittelwert der Klassen ober- und unterhalb des Medians durch die Quantile angegeben.



**Abbildung 31:** Verteilung der Versuchsdaten über die Zielgröße Produktkonzentration.

In Abbildung 32 sind die Signifikanzen der Versuchskombinationen dargestellt. Die vertikalen blauen Linien zeigen die Grenzen des Konfidenzniveaus. In diesem Fall gibt es eine signifikante

positive Kombination aus Glutamat und Tyrosin sowie eine signifikante negative Kombination aus Glutamat, Methionin und Tyrosin.

Des Weiteren wird mit Hilfe der linearen Regression ein statistisches Modell erzeugt, welches die beobachteten Messwerte zuverlässig vorhersagen kann. Hierzu wird die schrittweise Regression mit den Hauptparametern, den Aminosäuren Glu, His, Met und Tyr durchgeführt.

Term	Schätzer	Std.-Fehler	t-Wert		Wahrsch. >  t
Muster[+---+]	-0,754706	0,121409	-6,22		0,0249*
Muster[+---+]	0,5952941	0,121409	4,90		0,0392*
Muster[+---+]	0,3352941	0,121409	2,76		0,1099
Muster[-+++]	-0,324706	0,121409	-2,67		0,1160
Muster[-+++]	0,3052941	0,121409	2,51		0,1284
Muster[-+++]	0,2952941	0,121409	2,43		0,1355
Muster[++++]	-0,274706	0,121409	-2,26		0,1520
Muster[---+]	0,2452941	0,121409	2,02		0,1808
Muster[---+]	0,1652941	0,121409	1,36		0,3065
Muster[+++]	-0,144706	0,121409	-1,19		0,3556
Muster[---+]	-0,124706	0,121409	-1,03		0,4123
Muster[---+]	-0,114706	0,121409	-0,94		0,4445
Muster[----]	-0,094706	0,121409	-0,78		0,5170
Muster[+++]	-0,054706	0,121409	-0,45		0,6964
Muster[+---]	-0,014706	0,121409	-0,12		0,9147
Muster[+---]	0,0052941	0,121409	0,04		0,9692

**Abbildung 32:** Signifikanzen der Versuchskombination der Aminosäuren Glutamat, Histidin, Methionin und Tyrosin.

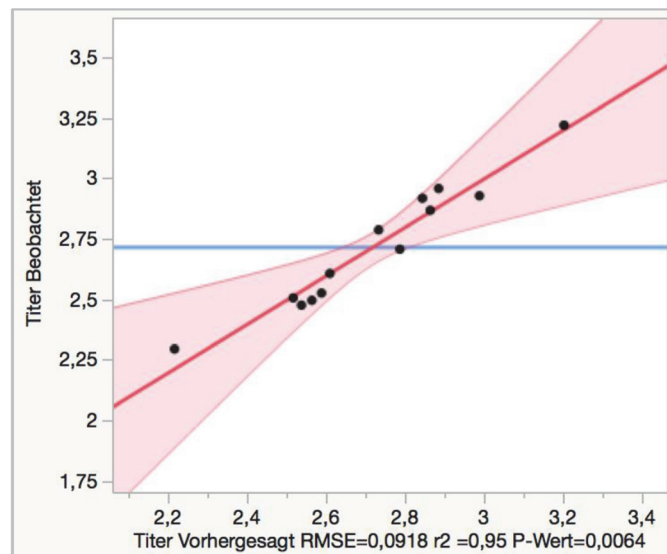
Zu Beginn liegt die Modellgüte des statistischen Modells bei circa 50 %, welche über das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  angegeben wird. Der Grund für eine geringe Modellgüte ist eine zu niedrige Anzahl der gewählten Parameter und Kombinationen, aus denen das statistische Modell aufgebaut ist. In dem Parameterscreening werden Methionin und die Wechselwirkung von Methionin und Tyrosin als signifikant festgestellt (Abbildung 33). Zur Erstellung des statistischen Modells wird zusätzlich der Einzeleffekt von Tyrosin verwendet. Es werden Glutamat und Histidin als Parameter und die Kombinationen von Glutamat\*Tyrosin, Glutamat\*Methionin und Histidin\*Tyrosin hinzugefügt. Mit Hilfe dieser Kombinationen steigt die Modellgüte von 50 % auf 89 % an.



Kontraste							
Term		Kontrast	Lenth's t-Wert	Einfacher p-Wert	Simultaner p-Wert		
Methionin		-0,119870	-1,76	0,0913	0,6827		
Histidin		-0,053339	-0,78	0,3991	1,0000		
Glutamat		-0,053339	-0,78	0,3991	1,0000		
Tyrosin		-0,040721	-0,60	0,5691	1,0000		
Methionin*Methionin		0,011167	0,16	0,8739	1,0000		
Methionin*Histidin		-0,010897	-0,16	0,8768	1,0000		
Methionin*Glutamat		-0,006309	-0,09	0,9304	1,0000		
Histidin*Glutamat		-0,049898	-0,73	0,4350	1,0000		
Methionin*Tyrosin		-0,165753	-2,44	0,0319*	0,2854		
Histidin*Tyrosin		0,026956	0,40	0,7035	1,0000		
Glutamat*Tyrosin		-0,005162	-0,08	0,9430	1,0000		
Methionin*Histidin*Glutamat		0,114134	1,68	0,1039	0,7439		
Methionin*Histidin*Tyrosin		0,101516	1,49	0,1349	0,8612		
Methionin*Glutamat*Tyrosin		-0,068251	-1,00	0,2884	0,9980		
Histidin*Glutamat*Tyrosin		0,037280	0,55	0,6035	1,0000		
Methionin*Histidin*Glutamat*Tyrosin		0,054486	0,80	0,3888	1,0000		
Null18		0,026219	0,39	0,7106	1,0000		
Null19		-0,031068	-0,46	0,6655	1,0000		

**Abbildung 33:** Statistisches Parameterscreening zur Feststellung der signifikanten Parameter und Kombinationen im DoE.

Durch die Eliminierung der signifikant streuenden Versuche kann die Modellgüte weiter verbessert werden. Das statistische Modell erreicht hierbei ein Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 95 % mit einem Signifikanzwert von 0,006, wie in Abbildung 34 gezeigt ist.



**Abbildung 34:** Übersicht der Modellgüte, der Validierung und des Signifikanzwertes P.

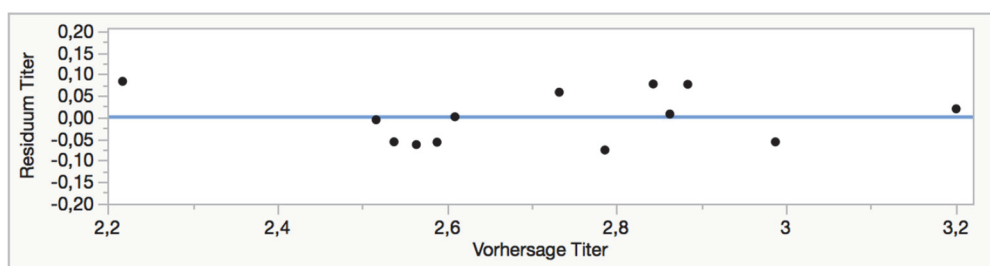
Mit Hilfe der Varianzanalyse werden die Parameter oder Kombinationen bestimmt, die einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße besitzen. Da das statistische Modell aus den vier Aminosäuren und drei weiteren Wechselwirkungen erzeugt wurde, können nur die Signifikanzen dieser Parameter bestimmt werden. In Abbildung 35 sind die positiven und negativen Signifikanzen der Parameter zu sehen.

Term	Schätzer	Std.-Fehler	t-Wert	Wahrsch. >  t
Methionin*Histidin	-0,150447	0,028622	-5,26	0,0033*
Methionin	-0,123915	0,029336	-4,22	0,0083*
Tyrosin*Methionin	-0,110858	0,029114	-3,81	0,0125*
Glutamat	0,1223958	0,035694	3,43	0,0187*
Tyrosin*Glutamat	0,1118382	0,033413	3,35	0,0204*
Tyrosin	0,0730882	0,033413	2,19	0,0804
Histidin	-0,022886	0,028622	-0,80	0,4602

**Abbildung 35:** Varianzanalyse des erzeugten statistischen Modells für die Zielgröße Produktkonzentration.

Methionin weist einen negativen Effekt auf die Zielgröße auf. Histidin zeigt ebenfalls einen negativen Effekt, der allerdings das Signifikanzniveau (vertikale blaue Linien) nicht erreicht, sodass dieser Effekt nicht signifikant ist. Dabei fällt auf, dass die Kombination aus Histidin und Methionin einen signifikant negativen Einfluss besitzt. Tyrosin hingegen zeigt eine nicht signifikante positive Tendenz. Glutamat weist einen signifikanten positiven Einfluss auf die Zielgröße Produktkonzentration auf. In der Literatur wird dieser positive Effekt durch niedrigere Konzentrationen an Ammonium und Lactat erklärt [Hong 2010, Ozturk 1992].

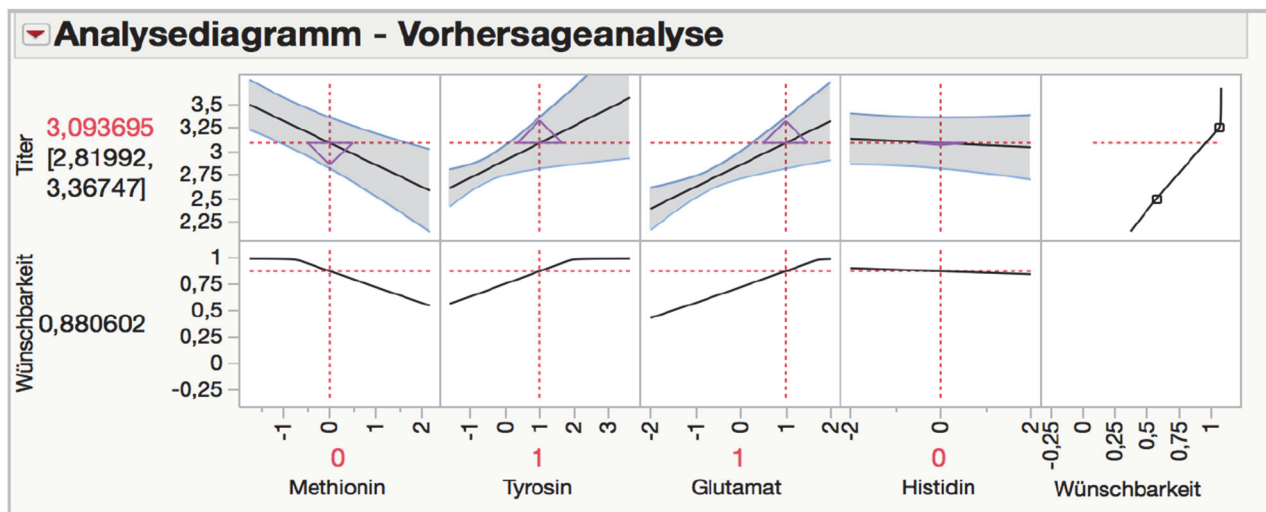
Die Residuen geben die Fehler zwischen der Vorhersage und den Messwerten an und werden daher zur Evaluierung der Plausibilität des statistischen Modells verwendet. Abbildung 36 zeigt die Residuen der Vorhersage über die Vorhersage der Produktkonzentration. Eine zufällige Streuung der Datenpunkte und gleichverteilte Messwerte oberhalb beziehungsweise unterhalb der Linie repräsentieren statistische Fehler und keine systematischen Fehler. In Abbildung 36 ist eine zufällige Streuung erkennbar. Die statistische Auswertung verliert bei systematischen Fehlern an Aussagekraft.



**Abbildung 36:** Beurteilung der Residuen zur Einschätzung von systematischen und statistischen Fehlern des statistischen Modells.

Mit Hilfe der Vorhersageanalyse werden die Auswirkungen der Variation der einzelnen Parameter im Zusammenhang mit den übrigen Parametern untersucht. Die Vorhersageanalyse in Abbildung 37 prognostiziert basierend auf dem statistischen Modell für die Kombination aus

Glutamat und Tyrosin eine Produktkonzentration von  $3,09 \text{ g L}^{-1}$ , der den beobachteten Wert von  $3,22 \text{ g L}^{-1}$  hinreichend approximiert. Das jeweilige Dreieck im Analysediagramm gibt die Sensitivität an, die eine Tendenz der Komponente auf das vollständige System ausdrückt. In diesem Fall wirken sich Tyrosin und Glutamat positiv aus, Histidin besitzt hier keinen Einfluss auf die Produktbildung und Methionin zeigt eine negative Tendenz. Diese Erkenntnisse sind zusätzlich an der Steigung der Geraden erkennbar.

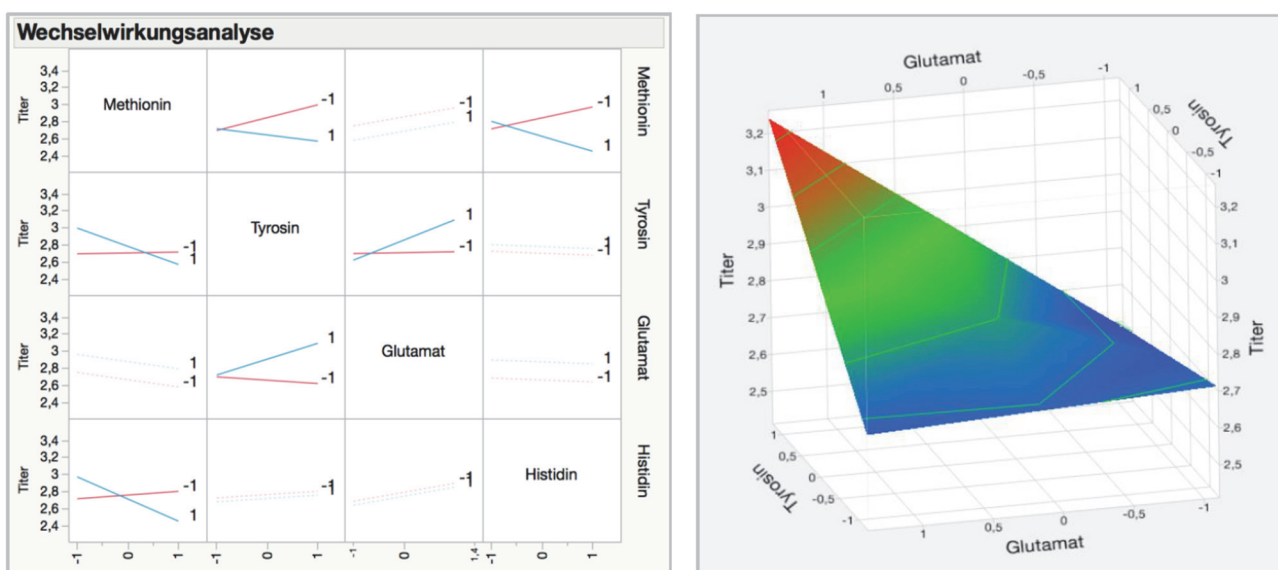


**Abbildung 37:** Vorhersageanalyse mit Sensitivitätsanalyse (Dreieck).

Durch die Wahl eines vollfaktoriellen Versuchsplans, können die Wechselwirkungen der Aminosäuren mit Hilfe der Abbildung 38 (links) untereinander analysiert werden. Die roten (-1) und blauen (1) Geraden geben durch ihre Steigung an, ob die Zugabe (blau) oder keine Zugabe (rot) der jeweiligen Aminosäuren einen positiven beziehungsweise negativen Einfluss auf die Zielgröße ausübt. Sind beide Geraden parallel zueinander existiert keine Wechselwirkung zwischen den Parametern. Sind diese einander zugeneigt, deutet das auf eine Wechselwirkung hin. Starke Wechselwirkungen zwischen den Parametern werden durch sich kreuzende Geraden gekennzeichnet. In Abbildung 38 (links) ist zu sehen, dass zwischen den untersuchten Parametern signifikante Wechselwirkungen existieren. Bei einigen Kombinationen, wie Histidin und Tyrosin, sind gestrichelte Geraden sichtbar. Diese Geraden resultieren aus der Anerkennung der Nullhypothese, wodurch diese Kombinationen nicht zur Erzeugung des statistischen Modells berücksichtigt werden. Aus diesem Grund können für diese Kombinationen keine Wechselwirkungen bestimmt werden. Die Wechselwirkung zwischen

Glutamat und Tyrosin weist für eine Zugabe beider Komponenten eine positive Auswirkung auf die Zielgröße Produktkonzentration auf.

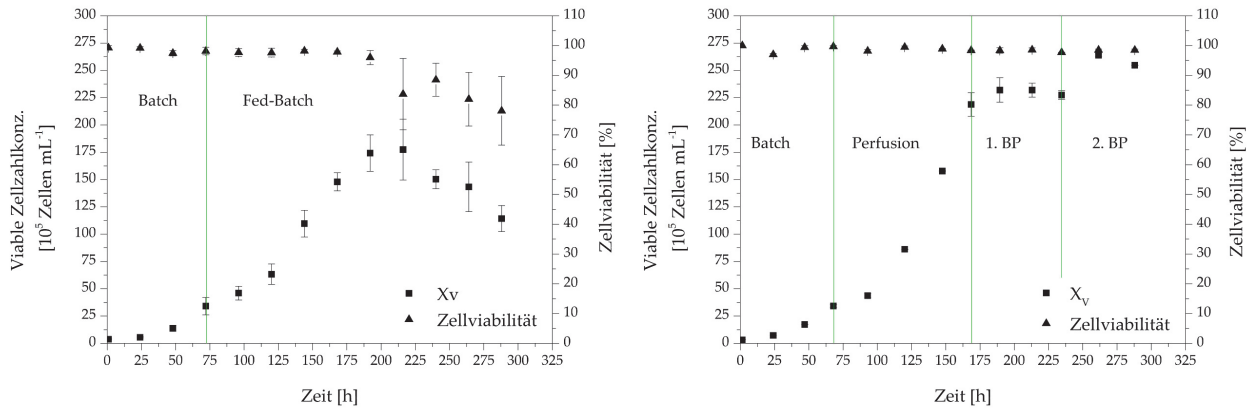
Die dreidimensionale Wirkungsflächenanalyse in Abbildung 38 (rechts) simuliert und visualisiert die Wechselwirkung von Glutamat und Tyrosin. Es ist zu erkennen, dass bei einer simultanen Zugabe von Glutamin und Tyrosin ein Maximum der Zielgröße erreicht werden kann. Die Schmetterlingsform der Wirkungsfläche deutet darauf hin, dass keine quadratischen Wechselwirkungen berücksichtigt werden, mit der das Optimum ermittelt werden könnte. Hierfür müsste ein Surface Response Model Design mit Starpoints durchgeführt werden.



**Abbildung 38:** Wechselwirkungsanalyse der einzelnen Aminosäuren (links). Wirkungsflächenanalyse des statistischen Modells zur Beschreibung des Effektes zwischen Glutamat und Tyrosin (rechts).

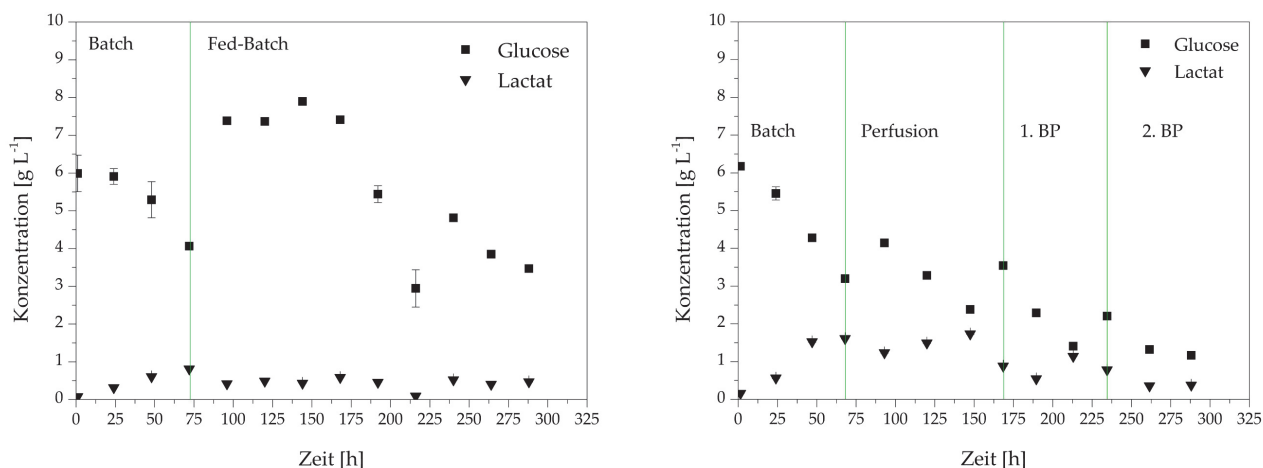
#### 4.2.2. Vergleich Fed-Batch zu Perfusion

In Abbildung 39 sind die viable Zellzahlkonzentration und Zellviabilität während drei Fed-Batch (links) und einer kontinuierlichen Kultivierung (rechts) gezeigt. Die Fed-Batch Kultivierungen erreichen nach 216 h Kultivierung im Mittel eine viable Zellzahlkonzentration von  $17,75 \pm 2,79 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ . Die Kultivierung endet nach zirka 288 h, da hier die Zellviabilität einen Wert von  $78,1 \pm 11,5 \%$  erreicht. Die Perfusion erreicht eine viable Zellzahlkonzentration von  $22,76 \pm 0,54 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  im ersten Betriebspunkt und  $25,93 \pm 0,46 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  im zweiten Betriebspunkt. Die Kontrolle der Zellzahlkonzentration wurde entsprechend des Kapitels 4.1.1 mit Hilfe einer Trübungssonde durchgeführt.



**Abbildung 39:** Viable Zellzahlkonzentration und Zellviabilität während drei Fed-Batch (links) und einer kontinuierlichen Kultivierung (rechts). Die Fehlerbalken repräsentieren drei Fed-Batch Kultivierungen beziehungsweise die Zweifachbestimmung der Prozessvariablen während der Perfusion. BP, Betriebspunkt.

Abbildung 40 zeigt den Verlauf der Glucose- und Lactatkonzentration während den drei Fed-Batch Kultivierungen (links) und der kontinuierlichen Kultivierung (rechts). Der Batchbetrieb bis 72 h Kultivierung ist sowohl für die viable Zellzahlkonzentration in Abbildung 39 als auch für die Glucose- und Lactatkonzentration für beide Verfahrensweisen ähnlich. Das Substrat Glucose wird in dieser Phase verbraucht und Lactat als Metabolit produziert. Im Anschluss an den Batchbetrieb beginnt die zyklische diskontinuierliche Zufütterung des Fed-Batch Betriebs und die Initiation der kontinuierlichen Zufütterung mit Hilfe von Pumpen während der Perfusion. Im Fall der Fed-Batch Verfahrensweise steigt die Glucosekonzentration aufgrund der Zufütterung an. Sobald eine höhere Zellzahlkonzentration erreicht wird, wird mehr Substrat verbraucht als hinzugeführt. Dies resultiert in der Abnahme der Substratkonzentration nach zirka 150 h Kultivierung in Abbildung 40 (links). Während des Perfusionsbetriebs stellt sich entsprechend der viablen Zellzahlkonzentration beziehungsweise des Betriebspunkts eine quasi-stationäre Substrat- und Metabolitkonzentration ein, die auf die stationäre viable Zellzahlkonzentration in Abbildung 39 (rechts) zurückzuführen ist.



**Abbildung 40:** Glucose- und Lactatkonzentration während drei Fed-Batch (links) und einer kontinuierlichen Kultivierung (rechts). Die Fehlerbalken repräsentieren drei Fed-Batch Kultivierungen beziehungsweise die Zweifachbestimmung der Prozessvariablen während der Perfusion. BP, Betriebspunkt.

Die Produktkonzentration während des Fed-Batch Prozesses erreicht einen Wert von  $3,0 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ , wie in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Konzentration des Antikörpers während der Perfusion sinkt auf eine maximale Produktkonzentration von  $0,5 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  aufgrund der Durchflussrate von  $1 \text{ V}_{\text{Reaktor}} \text{ d}^{-1}$ . Das verwendete Hohlfasermodule für die Zellrückhaltung besitzt eine Porengröße von  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  wodurch das Produkt ( $10,58 \text{ nm}$  hydrodynamischer Durchmesser [Armstrong 2004]) nicht zurückgehalten wird und aus dem Bioreaktor gewaschen wird. Aus diesem Grund wird während der Perfusion eine im Vergleich zum Fed-Batch geringere Produktkonzentration von  $17,6 \pm 3,0 \%$  erreicht. Die Durchflussrate sorgt jedoch für einen kontinuierlichen Austrag des Produkts aus dem Bioreaktor. Bezogen auf das Reaktorvolumen von  $1 \text{ L}$  kann eine volumetrische Produktivität von  $529,1 \pm 85,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht werden. Dies entspricht einer Steigerung der Produktivität von einem Faktor von  $2,1 \pm 0,3$  im Vergleich zum Fed-Batch Prozess ( $251,0 \pm 7,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), was auf die hohe viable Zellzahlkonzentration von  $22,76 \pm 0,54 \cdot 10^6 \text{ Zellen mL}^{-1}$  zurückzuführen ist.

**Tabelle 16:** Vergleich der Prozessvariablen während Fed-Batch (FB) und kontinuierlichen Kultivierungen.

Prozessvariable	Fed-Batch	Perfusion	Anteil Perfusion
Produktkonzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]	$3,0 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$17,6 \pm 3,0 \%$
Volumetrische Produktivität [ $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ]	$251,0 \pm 7,4$	$529,1 \pm 85,0$	$2,1 \pm 0,3 \times \text{FB}$
Produktreinheit [%]	$15,2 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,3$	$34,9 \pm 2,8 \%$

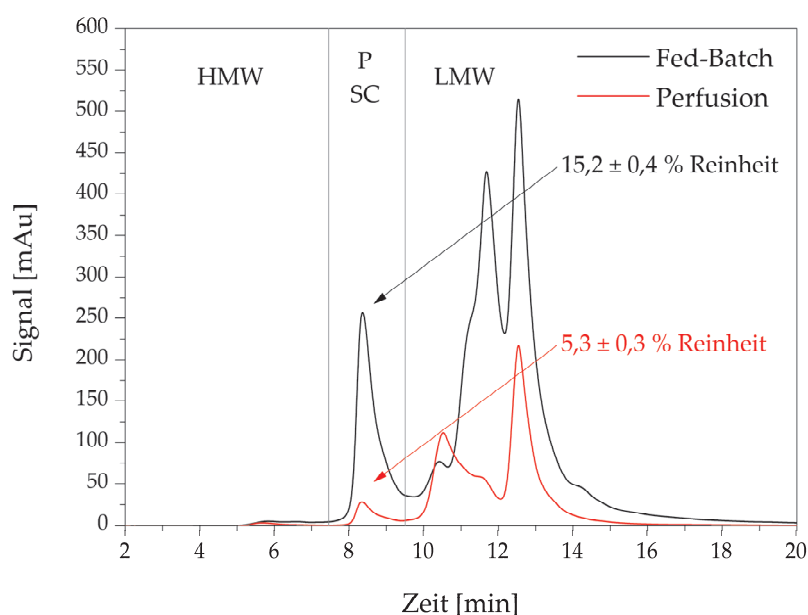


Die SEC-bezogene Produktreinheit während des Fed-Batch Prozesses besitzt einen Wert von  $15,2 \pm 0,4 \%$ , was einer zirka dreifach ( $2,87 \pm 0,18$ ) höheren Reinheit im Vergleich zur Perfusion ( $5,3 \pm 0,3 \%$ ) entspricht. Dies resultiert im Wesentlichen aus der höheren Produktkonzentration bei gleichzeitiger niedrigerer Zellzahlkonzentration des Fed-Batch Prozesses.

#### **4.2.3. Charakterisierung der Nebenkompontenten**

Die Abbildung 41 zeigt SEC Chromatogramme der zellfreien Lösung des Fed-Batch (schwarz) und kontinuierlichen (rot) Prozesses. Das Chromatogramm ist in die Bereiche der hochmolekularen (HMW) beziehungsweise niedermolekularen (LMW) Verunreinigungen, Produkt und Nebenkompontenten (SC) eingeteilt. Es ist zu erkennen, dass das Produktsignal bei zirka 8,5 Minuten im kontinuierlichen Prozess signifikant kleiner ist als im Fed-Batch Prozess (27,7 zu 255,4 mAu). Das Nebenkompontentenprofil im LMW-Bereich der beiden Verfahrensweisen unterscheidet sich in Art und Menge, wohingegen Aggregate oder hochmolekulare Verunreinigungen sich nicht wesentlich unterscheiden. Höhere Zellzahlkonzentration im kontinuierlichen Betrieb sorgen im Vergleich zur geringen Produktkonzentration für höhere Nebenkompontentenkonzentrationen, was durch die geringe SEC-basierte Reinheit von  $5,3 \pm 0,3 \%$  dargestellt wird.

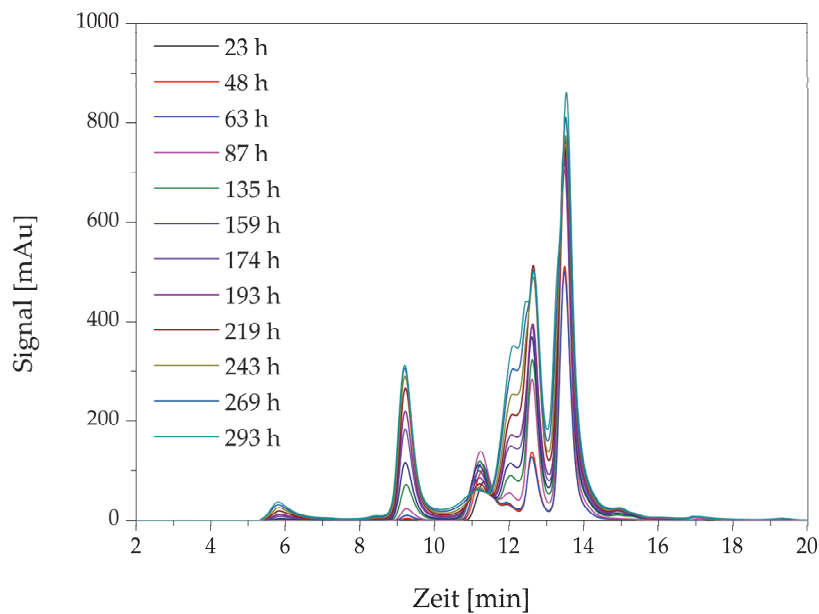
Diese unproportionale Verringerung der Haupt- und Nebenkompontenten während der kontinuierlichen Kultivierung führt zu einer veränderten Ausgangssituation für das anschließende Downstream Processing. Die während der Perfusion entstehenden Nebenkompontenten in Abbildung 41 besitzen im Bereich von zirka 10,5 Minuten ein höheres Signal (110,6 zu 75,7 mAu). Diese Nebenkompontenten wie HCPs oder DNA besitzen im Bereich der niedermolekularen Verunreinigungen den größten hydrodynamischen Radius und werden potentiell schwieriger durch filtrationsbasierte Verfahren wie der Ultra- und Diafiltration abgetrennt.



**Abbildung 41:** SEC Chromatogramme der zellfreien Lösung des Fed-Batch (schwarz) und kontinuierlichen (rot) Prozesses. HMW, hochmolekulare Verunreinigungen; P, Produkt; SC, Nebenkomponenten; LMW, niedermolekulare Verunreinigungen.

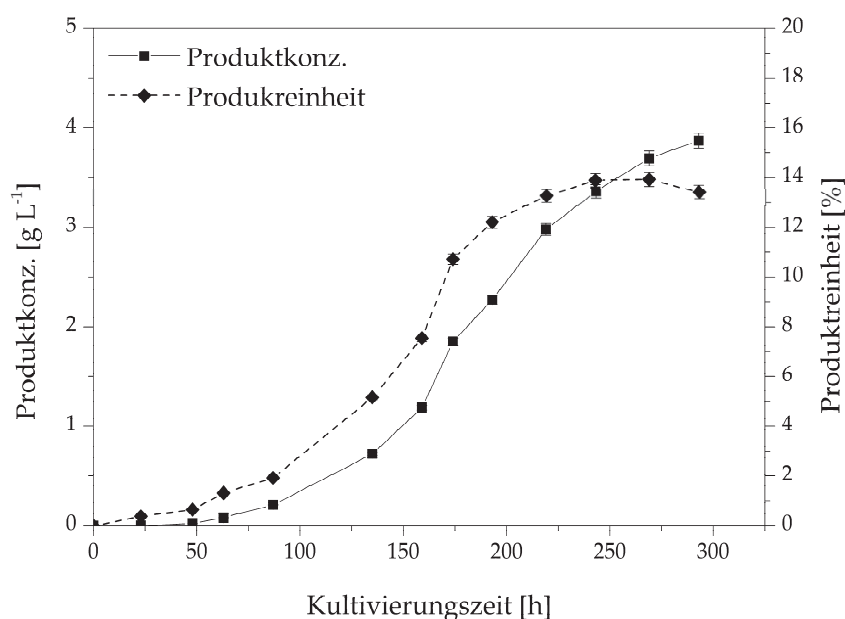
Die in Abbildung 41 erkenntliche Klasse an Nebenkomponenten zum Zeitpunkt von zirka 10,5 Minuten vergrößert sich mit längerer Kultivierungszeit, wie in den SEC-Chromatogrammen in Abbildung 42 bei zirka 11 Minuten zu erkennen ist. Nach zirka 87 h Kultivierung wird das Signal geringer (138,0 mAu zu 64,6 mAu nach 293 h) und das Nebenkomponentensignal im niedermolekularen Bereich bei zirka 12 Minuten höher (55,5 zu 351,6 mAu). Das Zellwachstum resultiert in einer Erhöhung der Produkt- und Nebenkomponentenkonzentration bis die stationäre Phase (192 h) erreicht wird, bei der Zellyse einsetzt und Wirtszellproteine und Wirtszell-DNA durch extrazelluläre Proteasen und Nukleasen enzymatisch in Nebenkomponenten mit einem kleineren hydrodynamischen Radius (zum Beispiel Peptide aus Proteinen) umgesetzt werden. Während der kontinuierlichen Kultivierung akkumulieren aufgrund der Durchflussrate und der hohen Zellviabilität weniger Proteasen und Nukleasen in der Biosuspension, was ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Produktqualität besitzt.





**Abbildung 42:** SEC Chromatogramme im Verlauf des Fed-Batch Prozesses über eine Kultivierungszeit von 293 h.

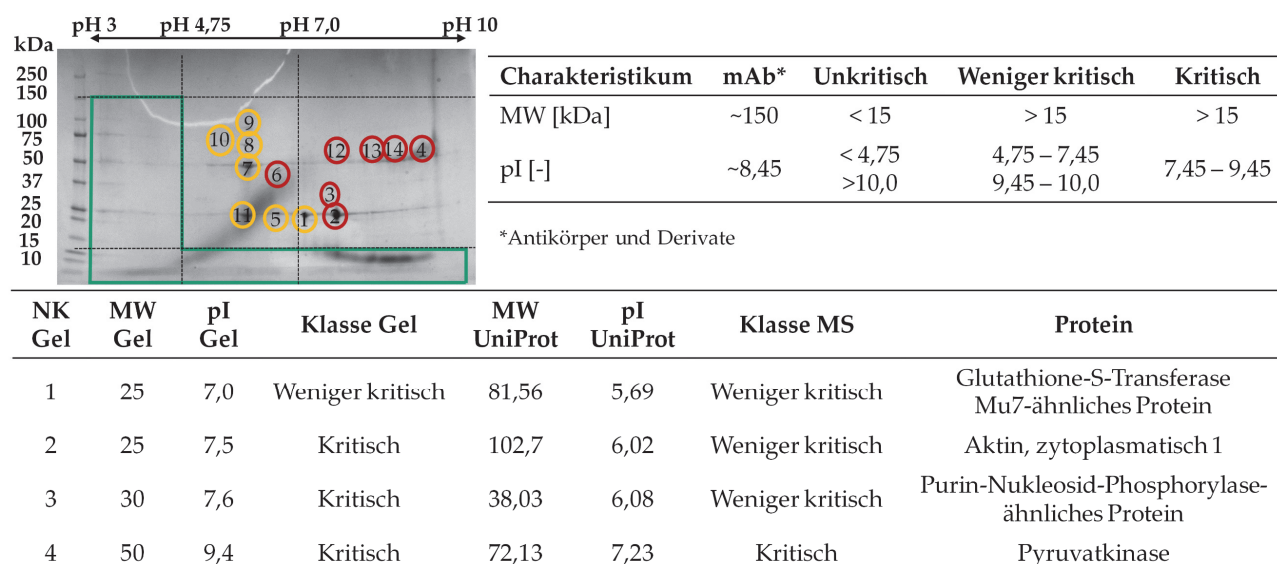
Die im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung ansteigende Produktkonzentration und -reinheit ist in Abbildung 43 zu sehen. Die ansteigende viable Zellzahlkonzentration in Abbildung 39 (links) resultiert aufgrund der Produktbildungsrate von  $2,25 \pm 0,51 \cdot 10^{-12} \text{ g}_{\text{Produkt}} \text{ Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in einer ansteigenden sigmoidal verlaufenden Produktkonzentration und -reinheit bis die Zellviabilität und die viable Zellzahlkonzentration sinkt und mehr Nebenkompenten als Zielprodukt freigesetzt werden, was durch die sinkende Reinheit ab zirka 225 h Kultivierung in Abbildung 43 dargestellt wird. Dieser Zeitpunkt während der Fed-Batch Kultivierung wäre ein sinnvoller Erntezeitpunkt, da der Zuwachs an Produkt die Nebenkompentenbildung nicht mehr kompensieren kann und extrazelluläre Proteasen die Produktqualität beeinflussen werden [Gao 2011, Gramer 1994, Park 2017, Robert 2009].



**Abbildung 43:** Verlauf der Produktkonzentration und SEC-basierter Produktreinheit im Verlauf des Fed-Batch Prozesses über eine Kultivierungszeit von 293 h. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Prozessvariablen.

Die analytischen Methoden fokussieren sich auf die Klassifizierung und Charakterisierung der HCPs. Analysen wie die 2D-SDS PAGE, IEX, HIC, SEC und LC-MS/MS bestimmen HCP Kriterien für einen effizienten DSP. Die Klassifizierungskriterien entsprechen den physikochemischen Eigenschaften der HCPs und des Produkts. In Abbildung 44 ist eine 2D-Gelelektrophorese der zellfreien Kultivierungslösung einer CHO DG44 Fed-Batch Kultivierung inklusive der Klassifizierung für die Abtrennung der Nebenkompenten und die durch LC-MS/MS Analysen identifizierte Nebenkompenten inklusive ihrer physikochemischen Eigenschaften zu sehen. Nebenkompenten mit einem Molekulargewicht kleiner als 15 kDa können für den DSP als unkritisch (grün) angesehen werden, da sie mit einem filtrationsbasierten Verfahrensschritt wie der Ultra- und Diafiltration entfernt werden können, wenn die Porengröße (engl. molecular weight cut-off, MWCO) entsprechend gewählt wird. Die Diafiltration ist eine für die Chromatographie notwendige Grundoperation, um das in der leichten Phase befindliche Polyethylenglykol 400 (PEG400) zu entfernen. PEG resultiert in einer viskoserer Lösung, wodurch chromatographische Verfahren unter anderem wegen des ansteigenden Druckverlustes schwieriger zu betreiben sind.

## 4 - Ergebnisse und Diskussion



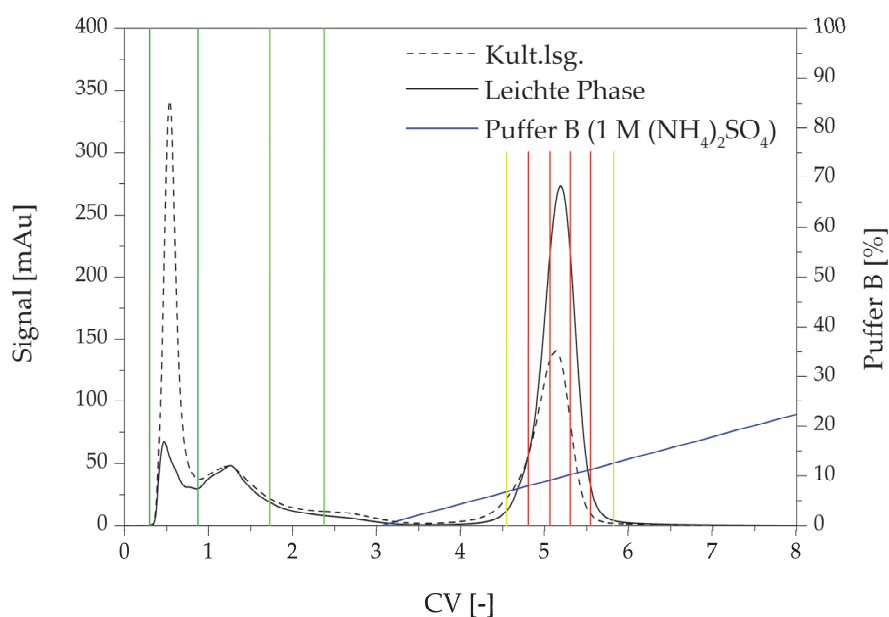
**Abbildung 44:** 2D-Gelelektrophorese der zellfreien Kultivierungslösung einer CHO DG44 Fed-Batch Kultivierung inklusive der Klassifizierung für die Abtrennung der Nebenkompenten (oben) und die durch LC-MS/MS Analysen identifizierte Nebenkompenten inklusive ihrer physikochemischen Eigenschaften (unten).

Nebenkompenten, die größer als 15 kDa sind, müssen mit Hilfe eines anderen Verfahrensschrittes abgetrennt werden, welcher auf anderen physikochemischen Eigenschaften basiert (zum Beispiel Ladung oder Hydrophobizität). Dementsprechend besitzen weniger kritische (orange) und kritische (rot) Nebenkompenten ein Molekulargewicht von mindestens 15 kDa. Die horizontale Linie bei 150 kDa in Abbildung 44 repräsentiert den monoklonalen Antikörper in dessen funktionalem Zustand. Die vertikalen Linien zeigen die isoelektrischen Punkte (pI) bei 4,75 und 7,0. Nebenkompenten mit einem pI von 4,75 können mit Hilfe eines salzsäurebasierten Präzipitationsschrittes in ihrer Konzentration signifikant reduziert werden [Gronemeyer 2016b]. Diese Nebenkompenten besitzen einen im Vergleich zum Zielprodukt unterschiedlichen pI, wodurch sie mit Hilfe einer Ionenaustauschchromatographie, wie in Abbildung 45 zu sehen, entfernt werden können und als unkritisch klassifiziert werden können. Die IEX Daten in Abbildung 45 zeigen eine ausgeprägt unterschiedliche Interaktion der Nebenkompenten mit der stationären Phase der IEX aufgrund der Oberflächenladung der Nebenkompenten. Diese Klasse eluiert nahe dem Hohlraumvolumen und kann einfach abgetrennt werden.

Nebenkompenten mit einem pI nahe des Zielprodukts (7,30 bis 9,30) sind mit Hilfe der IEX schwieriger abzutrennen und werden daher als kritisch klassifiziert. Dieser Bereich kann jedoch variabel sein, da die Trennleistung der IEX von den verwendeten Materialien (Säule, Pufferzusammensetzung) und Prozessparametern (Fluidgeschwindigkeit, Temperatur,

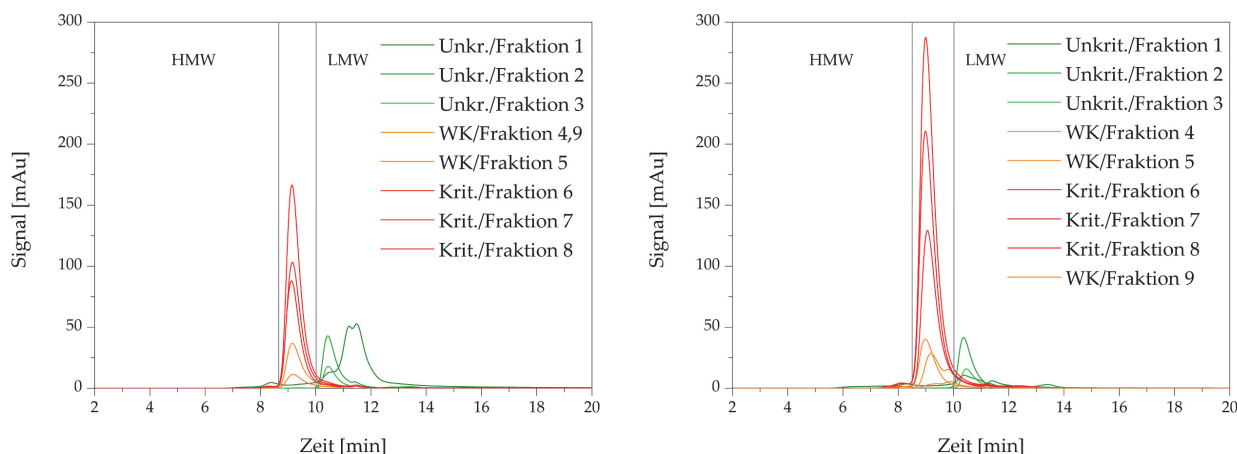
Gradientensteigung) abhängt [Fekete 2015, Liu 2010, Schulte 2000, Shukla 2007, Strube 1998, Strube 2000]. Nebenkomponenten, die Charakteristika zwischen unkritisch und kritisch besitzen, werden als weniger kritisch klassifiziert. Sie verfügen über einen pI zwischen 4,75 bis 7,30 und 9,30 bis 10,00 und können kritisch sein, wenn andere physikochemische Eigenschaften dem Produkt ähneln (zum Beispiel Hydrophobizität). Diese Abhängigkeit trifft auch auf kritische Nebenkomponenten zu. Da sie jedoch bereits als kritisch klassifiziert sind, werden sie nicht minder charakterisiert. Diese Abhängigkeit trifft für unkritische Nebenkomponenten nicht zu, da sie sich in mindestens einer physikochemischen Eigenschaft signifikant vom Zielprodukt unterscheiden. Der pI ist in dieser Charakterisierung aufgrund des festgelegten pH-Gradienten der isoelektrischen Fokussierung auf einen Wert von 10,00 limitiert.

Die Identifikation der Proteine beziehungsweise der Peptide in dem 2D-Gel in Abbildung 44 kann mit Hilfe der Kopplung der Flüssigchromatographie (LC, engl. liquid chromatography) mit einem Massenspektrometer (MS/MS) und einer Datenbank ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) durchgeführt werden. In Abbildung 44 sind fünf der vierzehn identifizierten Proteine aufgelistet. Die restlichen identifizierten Proteine befinden sich in der Tabelle A.4 im Anhang. Es ist erkennbar, dass das Molekulargewicht (MW) und der isoelektrische Punkt für die 2D-Gelelektrophorese nicht identisch mit den Daten der Proteindatenbank ist. Dies resultiert aus dem Vorhandensein verschiedener Proteinspezies aufgrund von posttranslationalen und proteolytischen (proteolytischer Abbau und Probenvorbereitung) Modifikationen. Im Gegensatz repräsentieren die durch ExPASy ([www.web.expasy.org/compute\\_pi/](http://www.web.expasy.org/compute_pi/)) theoretisch berechneten pI-Werte die unveränderte, volle Länge der Aminosäuresequenz. Dies führt zu einer Diskrepanz der unterschiedlichen Analysemethoden. Die 2D-Gelelektrophorese in Abbildung 44 ist für eine Visualisierung des Nebenkomponentenprofils anwendbar. Die SEC ist beispielsweise ein nicht-invasives Analyseverfahren zur Untersuchung der MW-Verteilung der Nebenkomponenten, falls die Salzkonzentrationen in den wässrigen Lösungen eine Trennung ermöglicht, die allein auf dem Ausschluss von Molekülgrößen aufgrund der hydrodynamischen Radien basiert [Ahmed 2010]. Die Abbildung 45 zeigt IEX Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung und der diafiltrierten leichten Phase nach der ATPE.



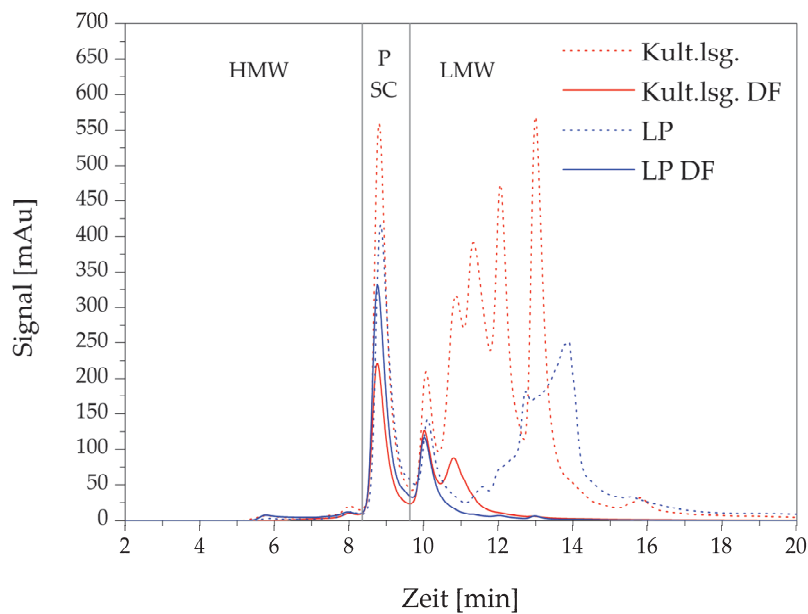
**Abbildung 45:** IEX Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung (---) und der diafiltrierten leichten Phase nach der ATPE (—).

Die vertikalen Linien entsprechen der Klassifizierung der NebenkompONENTEN in unkritisch (grün), weniger kritisch (orange) und kritisch (rot), welche mit Hilfe eines Fraktionssammlers anschließend mittels SEC analysiert wurden, wie in Abbildung 46 zu sehen. Die Fraktionen beschreiben die Trennung der NebenkompONENTEN basierend auf deren relativen Elution bezogen auf das Zielprodukt. Unkritische Fraktionen besitzen nicht- und leichtbindende Verunreinigungen, wohingegen der monoklonale Antikörper und die kritischen NebenkompONENTEN in den kritischen Fraktionen vorhanden sind. Im Fall der IEX werden Verunreinigungen als kritisch angesehen, wenn deren Oberflächenladung dem des Antikörpers entspricht und sie bei einer ähnlichen Salzkonzentration (hier 0,15 M, 15 % B) eluieren. Die in Abbildung 45 unkritischen NebenkompONENTEN (grün) besitzen laut Abbildung 46 ein Molekulargewicht, welches kleiner als das Produkt ist (niedermolekulare Verunreinigungen).

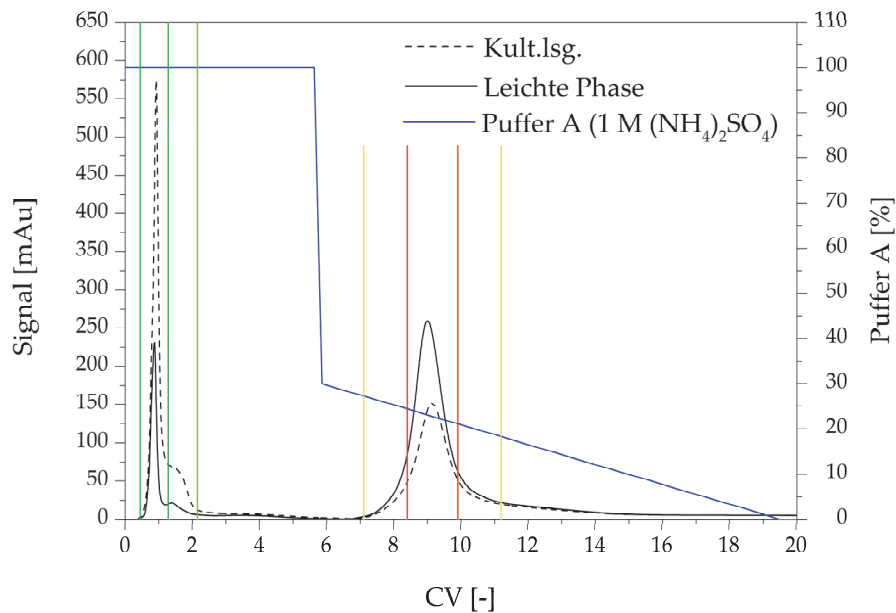


**Abbildung 46:** SEC Chromatogramme der Fraktionen aus Abbildung 45 der zellfreien Kultivierungslösung (links) und der diafiltrierten leichten Phase nach der ATPE (rechts). HMW, hochmolekulare Verunreinigungen; P, Produkt; SC, Nebenkomponenten; LMW, niedermolekulare Verunreinigungen.

Der Anteil der unkritischen Nebenkomponenten in der diafiltrierten leichten Phase ist signifikant kleiner (67,6 mAu zu 342,1 mAu). Dies ist sowohl in Abbildung 45 bei zirka 0,5 CV als auch in Abbildung 46 bei zirka 11,5 Minuten zu sehen. In Abbildung 47 ist der Einfluss der Diafiltration (MWCO 30 kDa) auf die Trennung der Nebenkomponenten zu sehen. Der Bereich um 11 Minuten wird nur durch die Anwendung der wässrigen Zweiphasenextraktion entfernt. Diese Nebenkomponenten besitzen laut den Chromatogrammen in Abbildung 45 eine negative oder neutrale Oberflächenladung, wodurch sie nur geringfügig mit dem Kationenaustauscher interagieren. Abbildung 46 zeigt hierbei, dass diese Klasse an Nebenkomponenten ein Molekulargewicht kleiner als 150 kDa (MW des monoklonalen Antikörpers) besitzt. Des Weiteren kann die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) für die Charakterisierung der Hydrophobizität der Nebenkomponenten eingesetzt werden. In Abbildung 48 sind HIC Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung und der diafiltrierten leichten Phase nach der ATPE zu sehen.



**Abbildung 47:** SEC Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung (- -), der diafiltrierten zellfreien Kultivierungslösung (-), der leichten Phase nach der ATPE (- -) und die diafiltrierte leichte Phase nach der ATPE (-). HMW, hochmolekulare Verunreinigungen; P, Produkt; SC, Nebenkomponten; LMW, niedermolekulare Verunreinigungen.



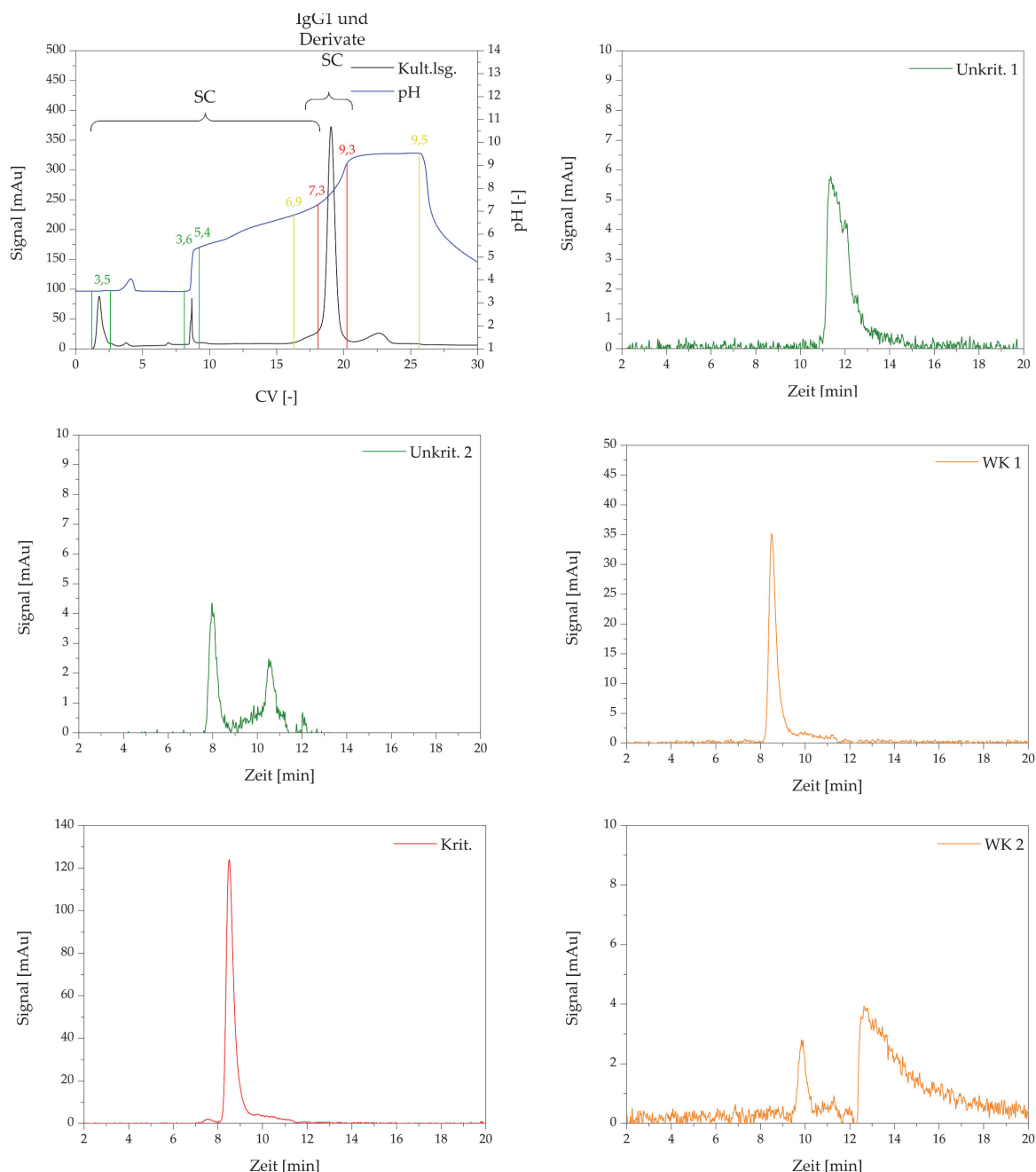
**Abbildung 48:** HIC Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung (- -) und der diafiltrierten leichten Phase nach der ATPE (-).

Es wird deutlich, dass die unkritischen hydrophilen Nebenkomponten bei zirka 1 bis 2 CV in Abbildung 48 durch den Einsatz der ATPE signifikant verringert werden (573,9 mAu zu 230,1 mAu

und 67,6 mAu zu 21,5 mAu). Die Kombination der Ergebnisse aus den IEX, HIC und SEC Analysen lässt darauf schließen, dass die ATPE anionische, hydrophile NebenkompONENTEN mit einem Molekulargewicht kleiner als 150 kDa abtrennt, wodurch die produktbezogene Reinheit ansteigt. Entsprechend der Tabelle 2 sind die abgetrennten Verunreinigungen vor allem anionische, hydrophile HCPs als auch Nukleinsäuren wie die DNA.

Die Oberflächenladung, die durch den isoelektrischen Punkt repräsentiert werden kann, ist neben dem Molekulargewicht und der Hydrophobizität eine wichtige physikochemische Eigenschaft, die die Trennaufgabe beeinflusst. Der isoelektrische Punkt kann wie in Abbildung 44 mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese oder LC-MS/MS Analysen bestimmt werden. Die Verwendung der IEX mit einem pH-Elutionsgradienten, wie in Abbildung 49 (links oben) zu sehen, besitzt jedoch den Vorteil, dass Proteine in ihrer tatsächlichen Konformation untersucht werden können. NebenkompONENTEN mit einem pI in der Nähe des monoklonalen Antikörpers (7,30 bis 9,30) sind aufgrund ihrer ähnlichen Oberflächenladungen schwierig abzutrennen (18 bis 21 CV, rote Fraktion). Die SEC Analysen in Abbildung 49 zeigen kritische (rote) NebenkompONENTEN, die ein Molekulargewicht kleiner als der monoklonale Antikörper besitzen. Verunreinigungen, die einen pI zwischen 6,9 bis 7,3 und 9,3 bis 9,5 aufweisen gelten als weniger kritisch, da sie mit Hilfe einer IEX oder einem filtrationsbasierten Verfahrensschritt abgetrennt werden können, da sie im Vergleich zum monoklonalen Antikörper im pI und MW unterschiedlich sind. NebenkompONENTEN mit einem pI kleiner als 6,9 und größer als 9,5 gelten als unkritisch, da sie mittels IEX einfach abgetrennt werden können.





**Abbildung 49:** IEX Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung (links oben) mit pH-Gradient und der daraus resultierenden SEC Chromatogramme der IEX-Fractionen. WK, weniger kritisch.

Die Klassifizierungskriterien basierend auf den physikochemischen Eigenschaften der Nebenkompenten für einen effizienten DSP sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Nachteile während der 2D-Gelelektrophorese sind die zeitintensive Probenvorbereitung, Proteindenaturierung durch die Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat) und Schwierigkeiten während der Quantifizierung der Proteinspezies. Diese Nachteile können durch die Verwendung von chromatographischen Analysen (IEX, HIC, SEC) adressiert werden. Es können dadurch ähnliche Charakteristika ermittelt werden und diese im Fall des isoelektrischen Punktes intensiviert

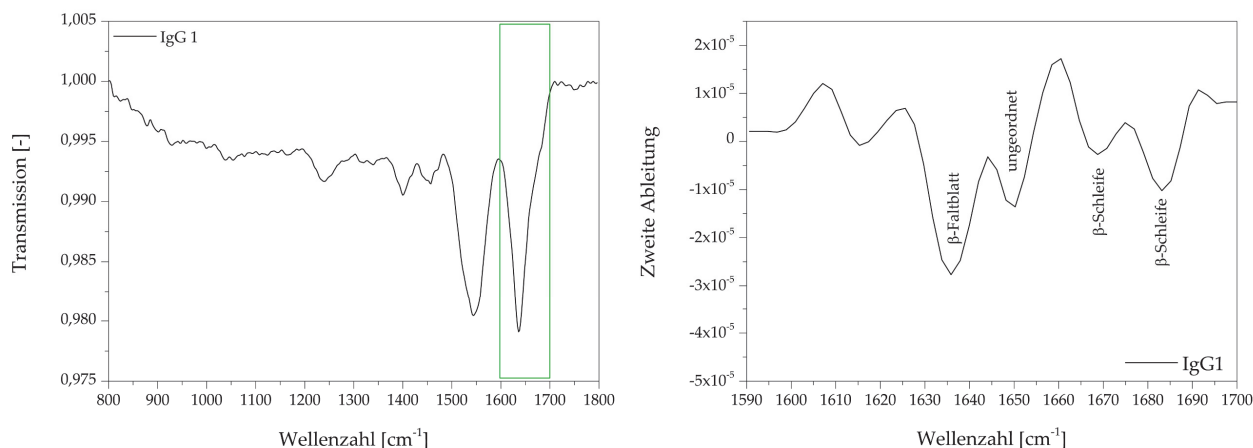
werden. Diese Methodik ist der Startpunkt für weitere Analysen, wie der Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie als auch der Proteinquantifizierung mittels ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) und generiert vor allem im Downstream Processing ein vertieftes Prozessverständnis.

**Tabelle 17:** Klassifizierung der Nebenkompenten basierend auf deren Abtrennbarkeit und physikochemischen Eigenschaften.

Charakteristikum	mAb und Derivate	Unkritisch	Weniger kritisch	Kritisch
MW [kDa]	~144,2	<30	>30	>30
pI [-]	~8,30	<4,75	4,75-7,30	7,30-9,30
(via 2D-GE)		>10,00	9,30-10,00	
Elution bei pH [-]	7,30-9,30	<6,90	6,90-7,30	7,30-9,30
(via IEX)		>9,50	9,30-9,50	

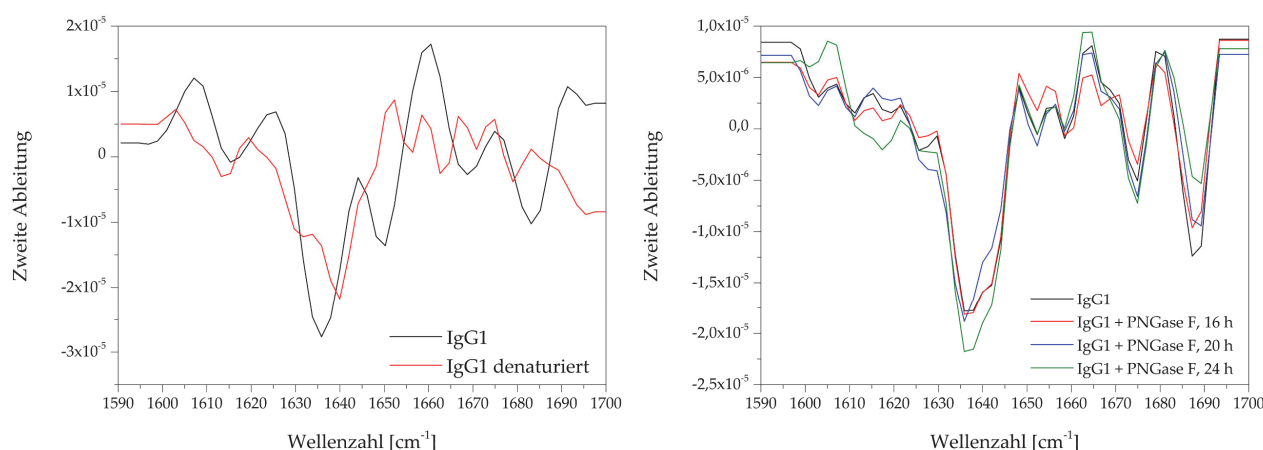
#### 4.2.4. Quality-by-Design

Die Produktqualität ist essentiell für den Vergleich unterschiedlicher Prozessverfahren. ATR-FTIR Analysen können für die Evaluation der Sekundärstruktur der Proteine angewendet werden. Die Analyse basiert auf der Interaktion der Proteine mit der infraroten Strahlung [Barth 2007, Martin 2003]. Diese Interaktion resultiert in strukturabhängigen Spektren. Sekundärstrukturen wie  $\beta$ -Faltblätter ( $1624\text{--}1642\text{ cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -Schleifen ( $1667\text{--}1685\text{ cm}^{-1}$ ),  $\alpha$ -Helices ( $1656 \pm 2\text{ cm}^{-1}$ ) oder ungeordnete Konfigurationen ( $1648 \pm 2\text{ cm}^{-1}$ ) generieren IR-Spektren, wie sie in Abbildung 50 zu sehen sind.



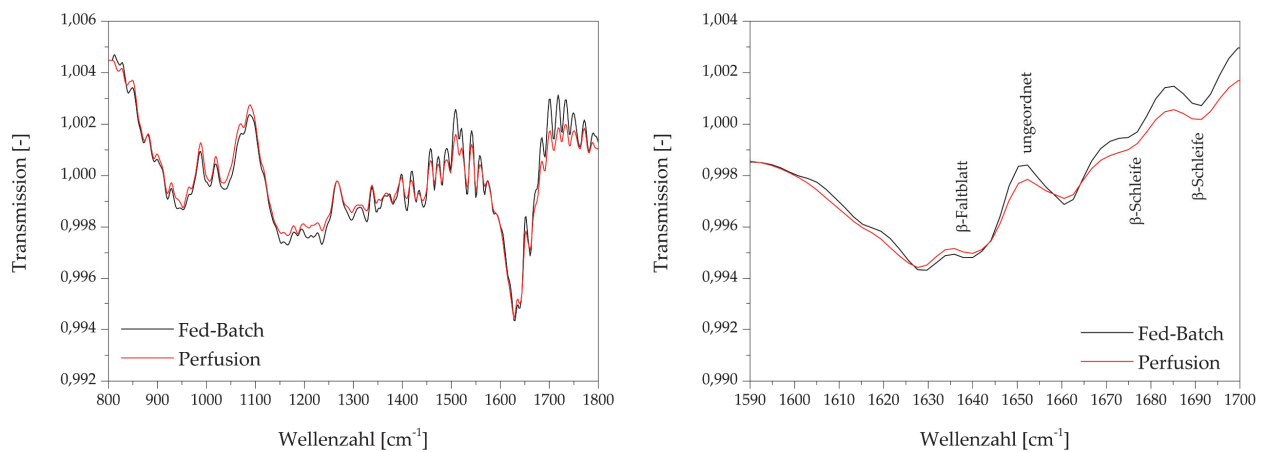
**Abbildung 50:** ATR-FTIR Analysen des monoklonalen Antikörpers. Transmissionsspektrum (links) und dessen zweite Ableitung (rechts).

ATR-FTIR Analysen, die die Produktqualität evaluieren, ermöglichen den qualitativen Nachweis der Sekundärstruktur des Zielproteins, da Variationen in den IR-Spektren durch Änderungen der Sekundärstruktur verursacht werden, wie in Abbildung 51 erkenntlich. Hierbei wurde der produzierte monoklonale Antikörper der Klasse IgG thermisch (links, 40 °C, 12 h) und enzymatisch via PNGase F (rechts, 24 h) denaturiert. Wenn die Spektren dem intakten Protein ähneln, kann davon ausgegangen werden, dass die Sekundärstruktur während der Herstellung erhalten bleibt. Die Denaturierung zeigt jedoch die Zunahme an ungeordneten Konfigurationen bei einer Wellenzahl von 1650  $\text{cm}^{-1}$ .



**Abbildung 51:** ATR-FTIR Spektren von IgG, welches thermisch (links, 40 °C, 12 h) und enzymatisch via PNGase F (rechts, 24 h) denaturiert wurde.

Abbildung 52 zeigt ATR-FTIR Spektren des IgG nach 288 h Fed-Batch und kontinuierlicher Kultivierung. Das während der kontinuierlichen Kultivierung produzierte IgG ähnelt hinsichtlich des IR-Spektrums dem IgG, welches bei der Fed-Batch Kultivierung produziert wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass die Sekundärstruktur während der Perfusion durch Scherkräfte während der Filtration nicht negativ beeinflusst wird. Online ATR-FTIR Analysen würden es ermöglichen *at-line* die Produktqualität zu bestimmen, um so das Prozessverständnis zu verbessern. Die Onlinemessung wird jedoch durch Nebenkomponten wie HCPs beeinflusst. Aufgrund der zunehmenden Produktreinheit im Verlauf des DSP wäre eine Integration einer online ATR-FTIR Analyse am Ende der Prozesskette sinnvoller.



**Abbildung 52:** ATR-FTIR Spektren des IgG nach 288 h Fed-Batch (schwarz) und kontinuierlicher (rot) Kultivierung.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Integration von Upstream und Downstream Processing für Biologics am Beispiel eines monoklonalen Antikörpers präsentiert. Die Methode basiert auf einer datengetriebenen Charakterisierung und Klassifizierung der im DSP zu trennenden NebenkompONENTEN, die zu einer rationalen Prozessentwicklung führt, indem kritische (schwer oder nicht abtrennbare) NebenkompONENTEN minimiert oder eliminiert werden. Der Einfluss von Medienkomponenten auf die Produktivität und der Verfahrensweise auf das NebenkompONENTENprofil wurde gezeigt und diskutiert. Die rationale Prozessentwicklung basiert auf dem QbD-Prinzip unter Einsatz eines digitalen Zwillings zur Prozessmodellierung und PAT-Methoden zur Prozesskontrolle. Prozesskontrollstrategien während der Kultivierung der tierischen Zellen umfassten den Einsatz von spektroskopischen Online-Analysen der Biosuspension mit Hilfe von Trübungssonden und der Raman-Spektroskopie für die Detektion essentieller Prozessvariablen wie der viablen Zellzahlkonzentration. Die Anwendung von Trübungssonden ist im Fed-Batch Betrieb durch die Zellviabilität limitiert. Bei einer Zellviabilität größer als  $90 \pm 2 \%$  (bis 234 h Kultivierung) kann die optische Dichte der Biosuspension mit der viablen Zellzahlkonzentration mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von  $\geq 0,98$  korreliert werden. Die totale Zellzahlkonzentration kann über die vollständige Prozesszeit mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von  $0,97 \pm 0,02$  mit der optischen Dichte bestimmt werden. Des Weiteren ist die exakte Inokulation des Bioreaktors und der Verlauf der Zunahme der Zellzahlkonzentration *in-situ* mess- und beobachtbar, was durch eine schnelle Detektion von Prozessabweichungen zu einer verbesserten Prozessrobustheit führt. Die Raman-Spektroskopie gekoppelt mit chemometrischen Auswertemethoden wie der PLS-Regression ist in der Lage die Limitation der Trübungssonde zu kompensieren, indem die Varianz der Raman-Spektraldaten mit der Varianz der jeweiligen Prozessvariable (hier viable Zellzahlkonzentration) korreliert wird. Dies führt zu einer PLS-Regression der Beschreibung der viablen Zellzahlkonzentration über die vollständige Prozesszeit durch die Raman-Spektraldaten mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von  $\geq 0,95$  und einem quadratischen Mittelwertfehler RMSE von  $\leq 13,82 \cdot 10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ . Eine mögliche Kombination von Trübungs- und Leitfähigkeitssonden kann den Einsatz und die komplexe Spektraldatenanalyse der Raman-Spektroskopie umgehen. Die Leitfähigkeit der offline gemessenen, zellfreien Kultivierungslösung besitzt bei einer hohen Zellviabilität ( $> 90 \%$ , bis 168 h Kultivierung) einen Wert von  $9,59 \pm 0,90 \text{ mS cm}^{-1}$ . Sobald die Zelllyse einsetzt und intrazelluläres Kalium frei wird, steigt die Leitfähigkeit signifikant auf einen Wert von  $12,20 \pm 0,37 \text{ mS cm}^{-1}$  an. Die andauernde Erniedrigung der Zellviabilität ( $80,9 \pm 0,6 \%$ , Ende der

Kultivierung bei 264 h) resultiert in einer Erhöhung der Leitfähigkeit ( $13,60 \pm 0,41 \text{ mS cm}^{-1}$ , Ende der Kultivierung bei 264 h). Die online Messung der Leitfähigkeit würde in diesem Fall zu einer höheren Datendichte und zu einem verbesserten Prozessverständnis führen.

Die kontinuierliche Kultivierung ist eine Verfahrensweise von Bioreaktoren, mit derer Hilfe die volumetrische Produktivität während der Herstellung rekombinanter Produkte erhöht werden kann. Der Einsatz der Trübungssonde ist hierbei nicht auf eine sinkende Zellviabilität limitiert. Mit Hilfe einer linearen Regression kann die online gemessene optische Dichte der Biosuspension mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von  $\geq 0,98$  in die viable Zellzahlkonzentration konvertiert werden. Dies ermöglicht den Betrieb eines Turbidostats, bei dem die optische Dichte und somit die viable Zellzahlkonzentration im Verlauf der stationären Phase der kontinuierlichen Kultivierung konstant gehalten wird. Durch die Verwendung einer Kontrollstrategie für die optische Dichte wurden zwei Betriebspunkte betrieben. Der erste Betriebspunkt lag bei einer Trübung von  $3415,52 \pm 17,79 \text{ FAU}$ , was einer viable Zellzahlkonzentration von  $22,76 \pm 0,62 \cdot 10^6 \text{ Zellen mL}^{-1}$  entspricht. Die Auswahl des zweiten Betriebspunkts basierte auf der Analyse möglicher Schwingungen der Kontrollstrategie und lag bei einer Trübung von  $4202,87 \pm 19,49 \text{ FAU}$ , was einer viable Zellzahlkonzentration von  $25,93 \pm 0,64 \cdot 10^6 \text{ Zellen mL}^{-1}$  entspricht. Das geringe Überschwingen der Trübung während des Wechsels der Betriebspunkte kann durch eine Erhöhung der Volumenströme der Bleed- und Zufuhrpumpe minimiert werden. Die Daten der Leitfähigkeitsmessung zeigten eine mittlere Leitfähigkeit von  $9,58 \pm 0,87 \text{ mS cm}^{-1}$  während der kontinuierlichen Kultivierung, was einer mittleren Zellviabilität von  $97,3 \pm 2,1 \%$  entspricht. Durch den Einsatz der Trübungssonde zum Betrieb eines Turbidostats konnte im Vergleich zum Fed-Batch Betrieb eine zirka zweifach ( $2,1 \pm 0,3$ ) höhere volumetrische Produktivität erreicht werden ( $529,1 \pm 85,0 \text{ mg}_{\text{Produkt}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  zu  $251,0 \pm 7,4 \text{ mg}_{\text{Produkt}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ).

Die Kombination der online gemessenen Trübungsdaten und dem makroskopisch kinetischem Prozessmodell führte zu einer Voraussage von essentiellen Substrat- und Metabolitkonzentrationen für die Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44. Das Prozessmodell ist in der Lage die offline gemessene Glucosekonzentration mit einem  $R^2 \geq 0,96$  und die offline gemessenen Lactatkonzentration mit einem  $R^2 \geq 0,90$  vorauszusagen. Diese Erkenntnisse können für die Prozessentwicklung hinsichtlich Fütterungsstrategien eingesetzt werden.

Der Einfluss der Aminosäurenkonzentration der eingesetzten Medien während der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 wurde mit Hilfe eines vollfaktoriellen statistischen Versuchsplans basierend auf dem Stoffwechsel der Aminosäuren im metabolischen Netzwerk untersucht. Es

konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus Glutamat und Tyrosin einen signifikant positiven Einfluss auf die Produktbildung besitzt, wodurch die Produktkonzentration um  $24,98 \pm 0,06$  % erhöht wurde. Eine Kombination aus Tyrosin und Methionin besaß einen negativen Einfluss auf die Produktbildung.

Die physikochemischen Eigenschaften der Nebenkomponten und die Produktqualität wurde durch den Einsatz von Analysen wie 2D-SDS PAGE, IEX, HIC, SEC, LC-MS/MS und ATR-FTIR beschrieben. Die Klassifizierungskriterien basieren auf den physikochemischen Eigenschaften der Nebenkomponten für einen effizienten DSP, wobei unkritische Nebenkomponten, wie Peroxiredoxin (laut LC-MS/MS Analysen, ExPASy und UniProt Datenbank, Tabelle A.4), ein Molekulargewicht von  $< 30$  kDa, einen isoelektrischen Punkt nach IEX von  $< 6,90$  und  $> 9,50$  besaßen. Weniger kritische Nebenkomponten, wie die Pyruvatkinase (laut LC-MS/MS Analysen, ExPASy und UniProt Datenbank, Tabelle A.4), besaßen ein Molekulargewicht von  $> 30$  kDa und einen Bereich des isoelektrischen Punkts nach IEX von  $6,90$  bis  $7,30$  sowie  $9,30$  bis  $9,50$ . Kritische Nebenkomponten, wie die Aldolase (laut LC-MS/MS Analysen, ExPASy und UniProt Datenbank, Tabelle A.4), besaßen ein Molekulargewicht von  $> 30$  kDa und einen Bereich des isoelektrischen Punkts nach IEX von  $7,30$  bis  $9,30$ . Nachteile während der 2D-Gelelektrophorese waren jedoch die zeitintensive Probenvorbereitung und Proteindenaturierung durch die Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat). Diese Nachteile konnten durch die Verwendung von chromatographischen Analysen (IEX, HIC, SEC) adressiert werden.

ATR-FTIR Spektren des monoklonalen Antikörpers aus Fed-Batch und kontinuierlichen Kultivierungen zeigten keine signifikanten Abweichungen in den Sekundärstrukturen des Produkts. Daraus wurde geschlossen, dass die Sekundärstruktur während der Filtration der Perfusion durch Scherkräfte nicht negativ beeinflusst wurde. Online ATR-FTIR Analysen am Ende der Prozesskette (zum Beispiel während des polishing) würden es ermöglichen, die Produktqualität zu analysieren, um so das Prozessverständnis zu verbessern.

## 6. Literaturverzeichnis

- [Abt 2018] Abt, V., Barz, T., Cruz-Bournazou, M. N., Herwig, C., Kroll, P., Möller, J., Pörtner, R., Schenkendorf, R. (2018): *Model-based tools for optimal experiments in bioprocess engineering*, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22, 244–252, DOI: 10.1016/j.coche.2018.11.007
- [ACTIP 2017] ACTIP: *Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use (status 2017)*  
<<http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/>> (17.06.2019)
- [Agarabi 2015] Agarabi, C. D., Schiel, J. E., Lute, S. C., Chavez, B. K., Boyne, M. T., Brorson, K. A., Khan, M. A., Read, E. K. (2015): *Bioreactor process parameter screening utilizing a plackett-burman design for a model monoclonal antibody*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104 (6), 1919–1928, DOI: 10.1002/jps.24420
- [Agarabi 2016] Agarabi, C. D., Chavez, B. K., Lute, S. C., Read, E. K., Rogstad, S., Awotwe-Otoo, D., Brown, M. R., Boyne, M. T., Brorson, K. A. (2016): *Exploring the linkage between cell culture process parameters and downstream processing utilizing a plackett-burman design for a model monoclonal antibody*, *Biotechnology Progress*, DOI: 10.1002/btpr.2402
- [Ahamed 2007] Ahamed, T., Nfor, B. K., Verhaert, P. D. E. M., van Dedem, G. W. K., van der Wielen, L. A. M., Eppink, M. H. M., van de Sandt, E. J. A. X., Ottens, M. (2007): *pH-gradient ion-exchange chromatography: an analytical tool for design and optimization of protein separations*, *Journal of chromatography. A*, 1164 (1-2), 181–188, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.07.010
- [Ahmed, U., Saunders, G. 2010] Ahmed, U., Saunders, G.: *The Effect of NaCl Concentration on Protein Size Exclusion Chromatography*  
<<http://cn.agilent.com/cs/library/applications/SI-02416.pdf>> (17.07.2017)



- [Ahn 2011] Ahn, W. S., Antoniewicz, M. R. (2011): *Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry*, *Metabolic Engineering*, 13 (5), 598–609, DOI: 10.1016/j.ymben.2011.07.002
- [Aiuti 2017] Aiuti, A., Roncarolo, M. G., Naldini, L. (2017): *Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe*, *EMBO molecular medicine*, 9 (6), 737–740, DOI: 10.15252/emmm.201707573
- [Albertsson 1961] Albertsson, P.Å. (1961): *Fractionation of particles and macromolecules in aqueous two-phase systems*, *Biochemical Pharmacology*, 5 (4), 351–358, DOI: 10.1016/0006-2952(61)90028-4
- [Al-Rubeai 2015] Al-Rubeai, M. (2015): *Animal cell culture*, *Cell engineering*, Vol. 9, Springer, Cham
- [Alt 2016] Alt, N., Zhang, T. Y., Motchnik, P., Taticek, R., Quarmby, V., Schlothauer, T., Beck, H., Emrich, T., Harris, R. J. (2016): *Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles*, *Biologicals*, 44 (5), 1–15, DOI: 10.1016/j.biologicals.2016.06.005
- [Altamirano 2001] Altamirano, C., Illanes, A., Casablancas, A., Gamez, X., Cairo, J. J., Godia, C. (2001): *Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture*, *Biotechnology Progress*, 17 (6), 1032–1041, DOI: 10.1021/bp0100981
- [Andrews 2005] Andrews, B. A., Schmidt, A. S., Asenjo, J. A. (2005): *Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity and charge*, *Biotechnology and Bioengineering*, 90 (3), 380–390, DOI: 10.1002/bit.20495
- [Armstrong 2004] Armstrong, J. K., Wenby, R. B., Meiselman, H. J., Fisher, T. C. (2004): *The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation*, *Biophysical Journal*, 87 (6), 4259–4270, DOI: 10.1529/biophysj.104.047746
-

- [Arnold 2003] Arnold, S. A., Crowley, J., Woods, N., Harvey, L. M., McNeil, B. (2003): *In-situ near infrared spectroscopy to monitor key analytes in mammalian cell cultivation*, *Biotechnology and Bioengineering*, 84 (1), 13–19, DOI: 10.1002/bit.10738
- [Asenjo 2011] Asenjo, J. A., Andrews, B. A. (2011): *Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective*, *Journal of Chromatography A*, 1218 (49), 8826–8835, DOI: 10.1016/j.chroma.2011.06.051
- [Ayyar 2012] Ayyar, B. V., Arora, S., Murphy, C., O'Kennedy, R. (2012): *Affinity chromatography as a tool for antibody purification*, *Methods (San Diego, Calif.)*, 56 (2), 116–129, DOI: 10.1016/j.ymeth.2011.10.007
- [Azevedo 2009] Azevedo, A. M., Gomes, A. G., Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Pisco, A. M. M. O., Aires-Barros, M. R. (2009): *Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems*, *Separation and Purification Technology*, 65 (1), 14–21, DOI: 10.1016/j.seppur.2007.12.010
- [Barth 2007] Barth, A. (2007): *Infrared spectroscopy of proteins*, *Biochimica et biophysica acta*, 1767 (9), 1073–1101, DOI: 10.1016/j.bbabbio.2007.06.004
- [Bechmann 2015] Bechmann, J., Rudolph, F., Gebert, L., Schaub, J., Greulich, B., Dieterle, M., Bradl, H. (2015): *Process parameters impacting product quality*, *BMC Proceedings*, 9 (Suppl 9), O7, DOI: 10.1186/1753-6561-9-S9-O7
- [Ben Yahia 2015] Ben Yahia, B., Malphettes, L., Heinzle, E. (2015): *Macroscopic modeling of mammalian cell growth and metabolism*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (17), 7009–7024, DOI: 10.1007/s00253-015-6743-6
- [Berry 2015] Berry, B., Moretto, J., Matthews, T., Smelko, J., Wiltberger, K. (2015): *Cross-scale predictive modeling of CHO cell culture growth and metabolites using Raman spectroscopy and multivariate analysis*, *Biotechnology Progress*, 31 (2), 566–577, DOI: 10.1002/btpr.2035
-

- [Biechele 2015] Biechele, P., Busse, C., Solle, D., Scheper, T., Reardon, K. (2015): *Sensor systems for bioprocess monitoring, Engineering in Life Sciences*, 15 (5), 469–488, DOI: 10.1002/elsc.201500014
- [Bielser 2018] Bielser, J.-M., Wolf, M., Souquet, J., Broly, H., Morbidelli, M. (2018): *Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing - A critical review, Biotechnology Advances*, 36 (4), 1328–1340, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.04.011
- [Birch 2006] Birch, J. R., Racher, A. J. (2006): *Antibody production, Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (5-6), 671–685, DOI: 10.1016/j.addr.2005.12.006
- [Bittner 2016] Bittner, D., Riel, M., Hartlep, M., Müller, H., Eiden, F. (2016): *Optimized Fed-Batch Fermentation by Use of Online Glucose Measurement - Advanced Process Control with Multivariate Feeding Strategies, Chemie Ingenieur Technik*, 88 (9), 1312, DOI: 10.1002/cite.201650197
- [Blondeel 2016] Blondeel, E. J.M., Ho, R., Schulze, S., Sokolenko, S., Guillemette, S. R., Slivac, I., Durocher, Y., Guillemette, J. G., McConkey, B. J., Chang, D., Aucoin, M. G. (2016): *An omics approach to rational feed, Journal of Biotechnology*, 234, 127–138, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.027
- [Bluma 2010] Bluma, A., Höpfner, T., Lindner, P., Rehbock, C., Beutel, S., Riechers, D., Hitzmann, B., Scheper, T. (2010): *In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: state of the art, Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398 (6), 2429–2438, DOI: 10.1007/s00216-010-4181-y
- [Bockhardt 1996] Bockhardt, A., Krause, I., Klostermeyer, H. (1996): *Determination of biogenic amines by RP-HPLC of the dabsyl derivatives, Z Lebensm Unters Forsch*, 203 (1), 65–70, DOI: 10.1007/BF01267772
- [Böldicke 2018] Böldicke, T. (2018): *Antibody Engineering*, InTech
- [Borchers 2013] Borchers, S., Freund, S., Rath, A., Streif, S., Reichl, U., Findeisen, R. (2013): *Identification of growth phases and influencing factors in*
-

- cultivations with AGE1.HN cells using set-based methods, PLoS ONE, 8 (8), e68124, DOI: 10.1371/journal.pone.0068124*
- [Boschert 2016] Boschert, S., Rosen, R., in *Mechatronic Futures: Challenges and Solutions for Mechatronic Systems and their Designers* (Eds: P. Hehenberger, D. Bradley), Springer International Publishing. Cham, s.l. **2016**
- [Bracewell 2015] Bracewell, D. G., Francis, R., Smales, C. M. (2015): *The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control, Biotechnology and Bioengineering, 112 (9), 1727–1737, DOI: 10.1002/bit.25628*
- Britsch, L., Schulte, M., Strube, J.: *Continuous method for separating substances according to molecular size, Google Patents 2003*
- [Brunner 2016] Brunner, M., Fricke, J., Kroll, P., Herwig, C. (2016): *Investigation of the interactions of critical scale-up parameters (pH, pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub>) on CHO batch performance and critical quality attributes, Bioprocess and Biosystems Engineering, 1–13, DOI: 10.1007/s00449-016-1693-7*
- [Bruynseels 2018] Bruynseels, K., Santoni de Sio, F., van den Hoven, J. (2018): *Digital Twins in Health Care: Ethical Implications of an Emerging Engineering Paradigm, Front. Genet., 9, 31, DOI: 10.3389/fgene.2018.00031*
- [Butler 2014] Butler, M., Spearman, M. (2014): *The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering, Current Opinion in Biotechnology, 30, 107–112, DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.010*
- [Carlsson 2009] Carlsson, B. (2009): *An introduction to modeling of bioreactors, 1–8, DOI:*
- [Carta 2010] Carta, G., Jungbauer, A. (2010): *Protein chromatography, Process development and scale-up, Wiley-VCH, Weinheim*
- [Chanda 2015] Chanda, A., Daly, A. M., Foley, D. A., LaPack, M. A., Mukherjee, S., Orr, J. D., Reid, G. L., Thompson, D. R., Ward, H. W. (2015):

- Industry Perspectives on Process Analytical Technology: Tools and Applications in API Development, Org. Process Res. Dev.*, 19 (1), 63–83, DOI: 10.1021/op400358b
- [Chandra 2010] Chandra, J. A.P., Samuel, R.D. S. (2010): *Modeling, Simulation and Control of Bioreactors Process Parameters - Remote Experimentation Approach, IJCA*, 1 (10), 103–110, DOI: 10.5120/216-365
- [Chee Fung Wong 2005] Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., Gek Sim Yap, M. (2005): *Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures, Biotechnology and Bioengineering*, 89 (2), 164–177, DOI: 10.1002/bit.20317
- [Chen 2008] Chen, J., Tetrault, J., Ley, A. (2008): *Comparison of standard and new generation hydrophobic interaction chromatography resins in the monoclonal antibody purification process, Journal of Chromatography A*, 1177 (2), 272–281, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.07.083
- [Chen 2014] Chen, N., Bennett, M. H., Kontoravdi, C. (2014): *Analysis of Chinese hamster ovary cell metabolism through a combined computational and experimental approach, Cytotechnology*, 66 (6), 945–966, DOI: 10.1007/s10616-013-9648-1
- [Chmiel 2011] Chmiel, H. (2011): *Bioprozesstechnik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [Chotteau 2015] Chotteau, V. (2015): *Perfusion Processes, Springer, Cham*, 9, 407–443, DOI: 10.1007/978-3-319-10320-4\_13
- [Christner 2014] Christner, M., Trusch, M., Rohde, H., Kwiatkowski, M., Schlüter, H., Wolters, M., Aepfelbacher, M., Hentschke, M. (2014): *Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-Toxigenic Escherichia coli, PLoS ONE*, 9 (7), e101924, DOI: 10.1371/journal.pone.0101924

- [Clarke 2013] Clarke, K. G. (2013): *Bioprocess engineering, An introductory engineering and life science approach*, Woodhead Pub. Ltd, Cambridge, UK
- [Collins 2006] Collins, W. E. (2006): *Protein Separation with Flow-Through Chromatography, Separation and Purification Methods*, 26 (2), 215–253, DOI: 10.1080/03602549708014159
- [Cramer 2011] Cramer, S. M., Holstein, M. A. (2011): *Downstream bioprocessing: recent advances and future promise*, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 1 (1), 27–37, DOI: 10.1016/j.coche.2011.08.008
- [Croughan 2015] Croughan, M. S., Konstantinov, K. B., Cooney, C. (2015): *The future of industrial bioprocessing: batch or continuous?*, *Biotechnology and Bioengineering*, 112 (4), 648–651, DOI: 10.1002/bit.25529
- [Del Val 2010] Del Val, I. J., Kontoravdi, C., Nagy, J. M. (2010): *Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns*, *Biotechnology Progress*, 26 (6), 1505–1527, DOI: 10.1002/btpr.470
- [Diamandis 1996] Diamandis, E. P., Christopoulos, T. K. (1996): *Immunoassay*, Academic Press, San Diego
- [Dismer 2013] Dismer, F., Alexander Oelmeier, S., Hubbuch, J. (2013): *Molecular dynamics simulations of aqueous two-phase systems: Understanding phase formation and protein partitioning*, *Chemical Engineering Science*, 96, 142–151, DOI: 10.1016/j.ces.2013.03.020
- [Doran 2013] Doran, P. M. (2013): *Bioprocess engineering principles*, 2.Aufl., Academic Press, Waltham, MA
- [Dorka 2009] Dorka, P., Fischer, C., Budman, H., Scharer, J. M. (2009): *Metabolic flux-based modeling of mAb production during batch and fed-batch operations*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (2), 183–196, DOI: 10.1007/s00449-008-0236-2

- [Dünnebier 1998] Dünnebier, G., Engell, S., Klatt, K.-U., Schmidt-Traub, H., Strube, J., Weirich, I. (1998): *Modeling of simulated moving bed chromatographic processes with regard to process control design*, *Computers & Chemical Engineering*, 22, S855-S858, DOI: 10.1016/S0098-1354(98)00165-3
- [Eggersgluess 2014] Eggersgluess, J. K., Richter, M., Dieterle, M., Strube, J. (2014): *Multi-stage aqueous two-phase extraction for the purification of monoclonal antibodies*, *Chemical Engineering and Technology*, 37 (4), 675–682, DOI: 10.1002/ceat.201300604
- [Ehgartner 2017] Ehgartner, D., Hartmann, T., Heinzl, S., Frank, M., Veiter, L., Kager, J., Herwig, C., Fricke, J. (2017): *Controlling the specific growth rate via biomass trend regulation in filamentous fungi bioprocesses*, *Chemical Engineering Science*, 172, 32–41, DOI: 10.1016/j.ces.2017.06.020
- [Ejima 2007] Ejima, D., Tsumoto, K., Fukada, H., Yumioka, R., Nagase, K., Arakawa, T., Philo, J. S. (2007): *Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies*, *Proteins*, 66 (4), 954–962, DOI: 10.1002/prot.21243
- [Esmonde-White 2017] Esmonde-White, K. A., Cuellar, M., Uerpmann, C., Lenain, B., Lewis, I. R. (2017): *Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409 (3), 637–649, DOI: 10.1007/s00216-016-9824-1
- [Ettinger 2014] Ettinger, A., Wittmann, T. (2014): *Fluorescence Live Cell Imaging*, *Methods in cell biology*, 123, 77–94, DOI: 10.1016/B978-0-12-420138-5.00005-7
- [EvaluatePharma 2018] EvaluatePharma (2018): *World Preview 2018, Outlook to 2024 (June)*, 1–47, DOI:

- [Faassen 2015] Faassen, S. M., Hitzmann, B. (2015): *Fluorescence spectroscopy and chemometric modeling for bioprocess monitoring*, *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15 (5), 10271–10291, DOI: 10.3390/s150510271
- [Farid 2019] Farid, S. S. (2019): *Integrated Continuous Biomanufacturing: Industrialization on the Horizon*, *Biotechnology Journal*, 14 (2), e1800722, DOI: 10.1002/biot.201800722
- [FDA 2004] FDA (2004): *Guidance for Industry, PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*
- [Fekete 2015] Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J.-L., Guilleme, D. (2015): *Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals*, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 113, 43–55, DOI: 10.1016/j.jpba.2015.02.037
- [Flatman 2007] Flatman, S., Alam, I., Gerard, J., Mussa, N. (2007): *Process analytics for purification of monoclonal antibodies*, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 848 (1), 79–87, DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.11.018
- [Fletcher 2005] Fletcher, T. (2005): *Designing Culture Media for Recombinant Protein Production*, *BioProcess International (January)*, 2–6, DOI:
- [Forsberg, N. et al. 2018] Forsberg, N., Glover, C., Hughes, J., Jaluria, P., King, D., Madsen, J., Moore, A., Nilsson, J., Pettit, S., Pincus, S., Sargent, B., Schwartz, C., TreDenick, T.: *Key Considerations in Gene Therapy Manufacturing for Commercialization* <<https://cellculturedish.com/wp-content/uploads/2018/09/Key-Considerations-Gen-Therapy-Manufacturing-Commercialization.pdf>> (14.09.2018)
- [Franke 2004] Franke, M., Górak, A., Strube, J. (2004): *Auslegung und Optimierung von hybriden Trennverfahren*, *Chemie Ingenieur Technik*, 76 (3), 199–210, DOI: 10.1002/cite.200406150



- [Fröhlich 2012] Fröhlich, H., Villian, L., Melzner, D., Strube, J. (2012): *Membrane Technology in Bioprocess Science, Chemie Ingenieur Technik*, 297 (4), n/a-n/a, DOI: 10.1002/cite.201200025
- [Fuenmayor 2017] Fuenmayor, J., Godia, F., Cervera, L. (2017): *Production of virus-like particles for vaccines, New Biotechnology*, 39 (Pt B), 174–180, DOI: 10.1016/j.nbt.2017.07.010
- [Gagnon 2012] Gagnon, P. (2012): *Technology trends in antibody purification, Journal of Chromatography A*, 1221, 57–70, DOI: 10.1016/j.chroma.2011.10.034
- [Gao 2007] Gao, J., Gorenflo, V. M., Scharer, J. M., Budman, H. M. (2007): *Dynamic metabolic modeling for a MAB bioprocess, Biotechnology Progress*, 23 (1), 168–181, DOI: 10.1021/bp060089y
- [Gao 2011] Gao, S. X., Zhang, Y., Stansberry-Perkins, K., Buko, A., Bai, S., Nguyen, V., Brader, M. L. (2011): *Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity, Biotechnology and Bioengineering*, 108 (4), 977–982, DOI: 10.1002/bit.22982
- [GE Healthcare 2010] GE Healthcare (2010): *Strategies for Protein Purification, Handbook*
- [Ghose 2013] Ghose, S., Tao, Y., Conley, L., Cecchini, D. (2013): *Purification of monoclonal antibodies by hydrophobic interaction chromatography under no-salt conditions, mAbs*, 5 (5), 795–800, DOI: 10.4161/mabs.25552
- [Glacken 1988] Glacken, M. W. (1988): *Catabolic Control of Mammalian Cell Culture, Nat Biotechnol*, 6 (9), 1041–1050, DOI: 10.1038/nbt0988-1041
- [Goey 2018] Goey, C. H., Alhuthali, S., Kontoravdi, C. (2018): *Host cell protein removal from biopharmaceutical preparations: Towards the implementation of quality by design, Biotechnology Advances*, 36 (4), 1223–1237, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.021
- [Goudar 2009] Goudar, C. T., Konstantinov, K. B., Piret, J. M. (2009): *Robust parameter estimation during logistic modeling of batch and fed-batch*

- culture kinetics, Biotechnology Progress, 25 (3), 801–806, DOI: 10.1002/btpr.154*
- [Graham 2015] Graham, L., Khrenov, A. (2015): *Risk Assessments and Control Strategies for Host Cell Proteins: FDA Expectations and Experiences*, CMC Strategy Forum, Washington DC
- [Gramer 1994] Gramer, M. J., Goochee, C. F. (1994): *Glycosidase activities of the 293 and NS0 cell lines, and of an antibody-producing hybridoma cell line, Biotechnology and Bioengineering, 43 (5), 423–428, DOI: 10.1002/bit.260430510*
- [Gronemeyer 2014] Gronemeyer, P., Ditz, R., Strube, J. (2014): *Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing, Bioengineering, 1 (4), 188–212, DOI: 10.3390/bioengineering1040188*
- [Gronemeyer 2016a] Gronemeyer, P., Ditz, R., Strube, J. (2016): *DoE based integration approach of upstream and downstream processing regarding HCP and ATPE as harvest operation, Biochemical Engineering Journal, 113, 158–166, DOI: 10.1016/j.bej.2016.06.016*
- [Gronemeyer 2016b] Gronemeyer, P., Ditz, R., Strube, J. (2016): *Implementation of aqueous two-phase extraction combined with precipitation in a monoclonal antibody manufacturing process, Chimica Oggi/Chemistry Today, 34 (3), 66–70, DOI:*
- [Grote 2011] Grote, F., Fröhlich, H., Strube, J. (2011): *Integration of Ultrafiltration Unit Operations in Biotechnology Process Design, Chemical Engineering & Technology, 34 (5), 673–687, DOI: 10.1002/ceat.201000484*
- [Gstraunthaler 2013] Gstraunthaler, G., Lindl, T. (2013): *Zell- und Gewebekultur, Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen, 7. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l.*
- [Gupta 2018] Gupta, S. K., Shukla, P. (2018): *Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins, Applied Microbiology and Biotechnology, 102 (24), 10457–10468, DOI: 10.1007/s00253-018-9430-*

- [Gustavsson 2015] Gustavsson, R., Lukasser, C., Mandenius, C.-F. (2015): *Control of specific carbon dioxide production in a fed-batch culture producing recombinant protein using a soft sensor*, *Journal of Biotechnology*, 200, 44–51, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.02.030
- [Hakemeyer 2016] Hakemeyer, C., McNight, N., St. John, R., Meier, S., Trexler-Schmidt, M., Kelley, B., Zettl, F., Puskeiler, R., Kleinjans, A., Lim, F., Wurth, C. (2016): *Process characterization and Design Space definition*, *Biologicals*, 44, 306–318, DOI: 10.1016/j.biologicals.2016.06.004
- [Hausmann 2017] Hausmann, R., Henkel, M., Hecker, F., Hitzmann, B., in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier **2017**
- [Hefzi 2016] Hefzi, H., Ang, K. S., Hanscho, M., Bordbar, A., Ruckerbauer, D., Lakshmanan, M., Orellana, C. A., Baycin-Hizal, D., Huang, Y., Ley, D., Martinez, V. S., Kyriakopoulos, S., Jiménez, N. E., Zielinski, D. C., Quek, L.-E., Wulff, T., Arnsdorf, J., Li, S., Lee, J. S., Paglia, G., Loira, N., Spahn, P. N., Pedersen, L. E., Gutierrez, J. M., King, Z. A., Lund, A. M., Nagarajan, H., Thomas, A., Abdel-Haleem, A. M., Zanghellini, J., Kildegaard, H. F., Voldborg, B. G., Gerdtzen, Z. P., Betenbaugh, M. J., Palsson, B. O., Andersen, M. R., Nielsen, L. K., Borth, N., Lee, D.-Y., Lewis, N. E. (2016): *A Consensus Genome-scale Reconstruction of Chinese Hamster Ovary Cell Metabolism*, *Cell systems*, 3 (5), 434–443.e8, DOI: 10.1016/j.cels.2016.10.020
- [Hinz 2006] Hinz, D. C. (2006): *Process analytical technologies in the pharmaceutical industry: The FDA's PAT initiative*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384 (5), 1036–1042, DOI: 10.1007/s00216-005-3394-y
- [Hong 2010] Hong, J. K., Cho, S. M., Yoon, S. K. (2010): *Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88 (4), 869–876, DOI: 10.1007/s00253-010-2790-1

- [Hong 2012] Hong, P., Koza, S., Bouvier, E. S. P. (2012): *Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates*, *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 35 (20), 2923–2950, DOI: 10.1080/10826076.2012.743724
- [Hong 2018] Hong, J. K., Lakshmanan, M., Goudar, C., Lee, D.-Y. (2018): *Towards next generation CHO cell line development and engineering by systems approaches*, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22, 1–10, DOI: 10.1016/j.coche.2018.08.002
- [Horvath 2010] Horvath, B., Mun, M., Laird, M. W. (2010): *Characterization of a monoclonal antibody cell culture production process using a quality by design approach*, *Molecular Biotechnology*, 45 (3), 203–206, DOI: 10.1007/s12033-010-9267-4
- [Huse 2002] Huse, K., Böhme, H.-J., Scholz, G. H. (2002): *Purification of antibodies by affinity chromatography*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51 (3), 217–231, DOI: 10.1016/S0165-022X(02)00017-9
- [Huter 2019] Huter, M., Strube, J. (2019): *Model-based Design and Process Optimization of Continuous Single Pass Tangential Flow Filtration Focusing on Continuous Bioprocessing - Accepted*, *Processes*, DOI:
- [I.-A. Nisipeanu 2011] I.-A. Nisipeanu, Elena Bunciu, Roxana Stanică (2011): *Bioprocesses parameters control in the case of a BIOSTAT A PLUS bioreactor* (2), DOI:
- [ICH Expert Working Group 1999] ICH Expert Working Group (1999): *SPECIFICATIONS: TEST PROCEDURES AND ACCEPTANCE CRITERIA FOR BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS Q6B*, *Ich Harmonised Tripartite Guideline*, 1–20, DOI:
- [ICH Expert Working Group 2009] ICH Expert Working Group (2009): *PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2)*, *Ich Harmonised Tripartite Guideline*, 1–28, DOI:

- [Ishihara 2005] Ishihara, T., Yamamoto, S. (2005): *Optimization of monoclonal antibody purification by ion-exchange chromatography: Application of simple methods with linear gradient elution experimental data*, *Journal of Chromatography A*, 1069 (1), 99–106, DOI: 10.1016/j.chroma.2004.10.040
- [Jain 2008] Jain, E., Kumar, A. (2008): *Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters*, *Biotechnology Advances*, 26 (1), 46–72, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.09.004
- [Jin 2010] Jin, M., Szapiel, N., Zhang, J., Hickey, J., Ghose, S. (2010): *Profiling of host cell proteins by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Implications for downstream process development*, *Biotechnology and Bioengineering*, 105 (2), 306–316, DOI: 10.1002/bit.22532
- [Johansson 1998] Johansson, H.-O., Karlström, G., Tjerneld, F., Haynes, C. A. (1998): *Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems*, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711 (1-2), 3–17, DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00585-9
- [Kager 2018] Kager, J., Herwig, C., Stelzer, I. V. (2018): *State estimation for a penicillin fed-batch process combining particle filtering methods with online and time delayed offline measurements*, *Chemical Engineering Science*, 177, 234–244, DOI: 10.1016/j.ces.2017.11.049
- [Karst 2016] Karst, D. J., Serra, E., Villiger, T. K., Soos, M., Morbidelli, M. (2016): *Characterization and comparison of ATF and TFF in stirred bioreactors for continuous mammalian cell culture processes*, *Biochemical Engineering Journal*, 110, 17–26, DOI: 10.1016/j.bej.2016.02.003
- [Kelley 2009] Kelley, B. (2009): *Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at a crossroads*, *mAbs*, 1 (5), 440–449, DOI: 10.4161/mabs.1.5.9448
- [Khawli 2010] Khawli, L. A., Goswami, S., Hutchinson, R., Kwong, Z. W., Yang, J., Wang, X., Yao, Z., Sreedhara, A., Cano, T., Tesar, D., Nijem, I.,
-

- Allison, D. E., Wong, P. Y., Kao, Y.-H., Quan, C., Joshi, A., Harris, R. J., Motchnik, P. (2010): *Charge variants in IgG1, mAbs*, 2 (6), 613–624, DOI: 10.4161/mabs.2.6.13333
  - [Kiparissides 2011] Kiparissides, A., Koutinas, M., Kontoravdi, C., Mantalaris, A., Pistikopoulos, E. N. (2011): ‘Closing the loop’ in biological systems modeling — From the in silico to the in vitro, *Automatica*, 47 (6), 1147–1155, DOI: 10.1016/j.automatica.2011.01.013
  - [Kishishita 2015] Kishishita, S., Nishikawa, T., Shinoda, Y., Nagashima, H., Okamoto, H., Takuma, S., Aoyagi, H. (2015): *Effect of temperature shift on levels of acidic charge variants in IgG monoclonal antibodies in Chinese hamster ovary cell culture*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (6), 700–705, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.028
  - [Kiss 2018] Kiss, B., Gottschalk, U., Pohlscheidt, M. (2018): *New bioprocessing strategies: development and manufacturing of recombinant antibodies and proteins*, *Advances in biochemical engineering, biotechnology*, Vol. 165, Springer, Cham
  - [Konakovsky 2016] Konakovsky, V., Clemens, C., Müller, M. M., Bechmann, J., Berger, M., Schlatter, S., Herwig, C. (2016): *Metabolic Control in Mammalian Fed-Batch Cell Cultures for Reduced Lactic Acid Accumulation and Improved Process Robustness*, *Bioengineering*, 3 (1), DOI: 10.3390/bioengineering3010005
  - [Kong 2007] Kong, J., Yu, S. (2007): *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures*, *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39 (8), 549–559, DOI: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x
  - [Konstantinov 2015] Konstantinov, K. B., Cooney, C. L. (2015): *White Paper on Continuous Bioprocessing May 20–21 2014 Continuous Manufacturing Symposium*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104 (3), 813–820, DOI: 10.1002/jps.24268
  - [Kontoravdi 2007] Kontoravdi, C., Asprey, S. P., Pistikopoulos, E. N., Mantalaris, A. (2007): *Development of a dynamic model of monoclonal antibody*
-

- production and glycosylation for product quality monitoring, Computers & Chemical Engineering*, 31 (5), 392–400, DOI: 10.1016/j.compchemeng.2006.04.009
- [Kornecki 2017] Kornecki, M., Mestmäcker, F., Zobel-Roos, S., Heikaus de Figueiredo, L., Schlüter, H., Strube, J. (2017): *Host Cell Proteins in Biologics Manufacturing, Antibodies*, 6 (3), 13, DOI: 10.3390/antib6030013
- [Kornecki 2018a] Kornecki, M., Schmidt, A., Strube, J. (2018): *PAT AS KEY-ENABLING TECHNOLOGY FOR QBD IN PHARMACEUTICAL MANUFACTURING – A CONCEPTUAL REVIEW ON UPSTREAM AND DOWNSTREAM PROCESSING*, *Chimica Oggi/Chemistry Today* (36), 44–48, DOI:
- [Kornecki 2018b] Kornecki, M., Strube, J. (2018): *Process Analytical Technology for Advanced Process Control in Biologics Manufacturing with the Aid of Macroscopic Kinetic Modeling*, *Bioengineering*, 5 (1), DOI: 10.3390/bioengineering5010025
- [Kornecki 2019] Kornecki, M., Strube, J. (2019): *Accelerating Biologics Manufacturing by Upstream Process Modelling*, *Processes*, 7 (3), 166, DOI: 10.3390/pr7030166
- [Kramberger 2015] Kramberger, P., Urbas, L., Štrancar, A. (2015): *Downstream processing and chromatography based analytical methods for production of vaccines, gene therapy vectors, and bacteriophages*, *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11 (4), 1010–1021, DOI: 10.1080/21645515.2015.1009817
- [Krause 1995] Krause, I., Bockhardt, A., Neckermann, H., Henle, T., Klostermeyer, H. (1995): *Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dansyl derivatives*, *Journal of Chromatography A*, 715 (1), 67–79, DOI: 10.1016/0021-9673(95)00578-B

- [Kritzinger 2018] Kritzinger, W., Karner, M., Traar, G., Henjes, J., Sihn, W. (2018): *Digital Twin in manufacturing: A categorical literature review and classification*, *IFAC-PapersOnLine*, 51 (11), 1016–1022, DOI: 10.1016/j.ifacol.2018.08.474
- [Kroll 2017a] Kroll, P., Hofer, A., Ulonska, S., Kager, J., Herwig, C. (2017): *Model-Based Methods in the Biopharmaceutical Process Lifecycle*, *Pharmaceutical Research*, 34 (12), 2596–2613, DOI: 10.1007/s11095-017-2308-y
- [Kroll 2017b] Kroll, P., Stelzer, I. V., Herwig, C. (2017): *Soft sensor for monitoring biomass subpopulations in mammalian cell culture processes*, *Biotechnology letters*, 39 (11), 1667–1673, DOI: 10.1007/s10529-017-2408-0
- [Krull 2012] Krull, I. S., Rakesh Mendhe, Anurag S. Rathore (2012): *Tools for Enabling Process Analytical Technology Applications in Biotechnology*
- [Kushnir 2012] Kushnir, N., Streatfield, S. J., Yusibov, V. (2012): *Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development*, *Vaccine*, 31 (1), 58–83, DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083
- [Ladisch 2015] Ladisch, M. R. (2015): *Bioprocess Engineering (Biotechnology)*, Van Nostrand's Scientific Encyclopedia, American Cancer Society
- [Lamanna 2017] Lamanna, W. C., Mayer, R. E., Rupprechter, A., Fuchs, M., Higel, F., Fritsch, C., Vogelsang, C., Seidl, A., Toll, H., Schiestl, M., Holzmann, J. (2017): *The structure-function relationship of disulfide bonds in etanercept*, *Scientific reports*, 7 (1), 3951, DOI: 10.1038/s41598-017-04320-5
- [Li 2010] Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R., Amanullah, A. (2010): *Cell culture processes for monoclonal antibody production*, *mAbs*, 2 (5), 466–479, DOI: 10.4161/mabs.2.5.12720



- [Liu 2010] Liu, H. F., Ma, J., Winter, C., Bayer, R. (2010): *Recovery and purification process development for monoclonal antibody production*, *mAbs*, 2 (5), 480–499, DOI: 10.4161/mabs.2.5.12645
- [Liu 2013] Liu, H., Ponniah, G., Neill, A., Patel, R., Andrien, B. (2013): *Accurate determination of protein methionine oxidation by stable isotope labeling and LC-MS analysis*, *Analytical chemistry*, 85 (24), 11705–11709, DOI: 10.1021/ac403072w
- [Liu 2017] Liu, Y., Gunawan, R. (2017): *Bioprocess optimization under uncertainty using ensemble modeling*, *Journal of Biotechnology*, 244, 34–44, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.013
- [Lourenço 2012] Lourenço, N. D., Lopes, J. A., Almeida, C. F., Sarraguça, M. C., Pinheiro, H. M. (2012): *Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: A review*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404 (4), 1211–1237, DOI: 10.1007/s00216-012-6073-9
- [Luttmann 2012] Luttmann, R., Bracewell, D. G., Cornelissen, G., Gernaey, K. V., Glassey, J., Hass, V. C., Kaiser, C., Preusse, C., Striedner, G., Mandenius, C.-F. (2012): *Soft sensors in bioprocessing*, *Biotechnology Journal*, 7 (8), 1040–1048, DOI: 10.1002/biot.201100506
- [Mahn 2012] Mahn, A., in *Biomedical Science, Engineering and Technology* (Eds: D. N. Ghista), InTech **2012**
- [Marks 2003] Marks, D. M. (2003): *Equipment design considerations for large scale cell culture*, *Cytotechnology*, 42 (1), 21–33, DOI: 10.1023/A:1026103405618
- [Martin 2003] Martin, I., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M. (2003): *Attenuated total reflection IR spectroscopy as a tool to investigate the orientation and tertiary structure changes in fusion proteins*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1614 (1), 97–103, DOI: 10.1016/S0005-2736(03)00167-6
- [Martinez 2013] Martinez, V. S., Dietmair, S., Quek, L.-E., Hodson, M. P., Gray, P., Nielsen, L. K. (2013): *Flux balance analysis of CHO cells before and*
-

- after a metabolic switch from lactate production to consumption, Biotechnology and Bioengineering*, 110 (2), 660–666, DOI: 10.1002/bit.24728
- [Merchuk 1998] Merchuk, J. C., Andrews, B. A., Asenjo, J. A. (1998): *Aqueous two-phase systems for protein separation*, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711 (1-2), 285–293, DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00594-X
- [Mercier 2016] Mercier, S. M., Rouel, P. M., Lebrun, P., Diepenbroek, B., Wijffels, R. H., Streefland, M. (2016): *Process analytical technology tools for perfusion cell culture*, *Engineering in Life Sciences*, 16 (1), 25–35, DOI: 10.1002/elsc.201500035
- [Möllerl 2015] Möllerl, J., Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R. (2015): *Model-based DoE for feed batch cultivation of a CHO cell line*, *BMC Proceedings*, 9 (Suppl 9), P42, DOI: 10.1186/1753-6561-9-S9-P42
- [Monod 1949] Monod, J. (1949): *The Growth of Bacterial Cultures*, *Annu. Rev. Microbiol.*, 3 (1), 371–394, DOI: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103
- [Moore 2012] Moore, C. M. V. (2012): *Quality by Design – FDA Lessons Learned and Challenges for International Harmonization*, International Conference on Drug Development, Austin, TX
- [Musmann 2016] Musmann, C., Joeris, K., Markert, S., Solle, D., Scheper, T. (2016): *Spectroscopic methods and their applicability for high-throughput characterization of mammalian cell cultures in automated cell culture systems*, *Engineering in Life Sciences*, 16 (5), 405–416, DOI: 10.1002/elsc.201500122
- [Naderi 2011] Naderi, S., Meshram, M., Wei, C., McConkey, B., Ingalls, B., Budman, H., Scharer, J. (2011): *Development of a mathematical model for evaluating the dynamics of normal and apoptotic Chinese hamster ovary cells*, *Biotechnology Progress*, 27 (5), 1197–1205, DOI: 10.1002/btpr.647
-

- [Natarajan 2013] Natarajan, V., Zydney, A. L. (2013): *Protein A chromatography at high titers*, *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (9), 2445–2451, DOI: 10.1002/bit.24902
- [Nelson 1991] Nelson, K. L., Geyer, S. (1991): *Bioreactor and process design for large-scale mammalian cell culture manufacturing*, *Bioprocess technology*, 13, 112–143, DOI:
- [Nfor 2009] Nfor, B. K., Verhaert, P. D. E. M., van der Wielen, L. A. M., Hubbuch, J., Ottens, M. (2009): *Rational and systematic protein purification process development: the next generation*, *Trends in Biotechnology*, 27 (12), 673–679, DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.09.002
- [Nicolae 2014] Nicolae, A., Wahrheit, J., Bahnemann, J., Zeng, A.-P., Heinzle, E. (2014): *Non-stationary <sup>13</sup>C metabolic flux analysis of Chinese hamster ovary cells in batch culture using extracellular labeling highlights metabolic reversibility and compartmentation*, *BMC systems biology*, 8, 50, DOI: 10.1186/1752-0509-8-50
- [Nyberg 1999] Nyberg, G. B., Balcarcel, R. R., Follstad, B. D., Stephanopoulos, G., Wang, D. I. C. (1999): *Metabolism of peptide amino acids by Chinese hamster ovary cells grown in a complex medium*, *Biotechnology and Bioengineering*, 62 (3), 324–335, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990205)62:3<324:AID-BIT9>3.0.CO;2-C
- [Oguchi 2006] Oguchi, S., Saito, H., Tsukahara, M., Tsumura, H. (2006): *pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture*, *Cytotechnology*, 52 (3), 199–207, DOI: 10.1007/s10616-007-9059-2
- [Omasa 2010] Omasa, T., Onitsuka, M., Kim, W.-D. (2010): *Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells*, *Current pharmaceutical biotechnology*, 11 (3), 233–240, DOI: 10.2174/138920110791111960

- [Otto 2017] Otto, M. (2017): *Chemometrics, Statistics and computer application in analytical chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH et Co. KGaA, Weinheim
- [Ozturk 1992] Ozturk, S. S., Riley, M. R., Palsson, B. O. (1992): *Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production*, *Biotechnology and Bioengineering*, 39 (4), 418–431, DOI: 10.1002/bit.260390408
- [Park 2017] Park, J. H., Jin, J. H., Lim, M. S., An, H. J., Kim, J. W., Lee, G. M. (2017): *Proteomic Analysis of Host Cell Protein Dynamics in the Culture Supernatants of Antibody-Producing CHO Cells*, *Scientific reports*, 7, 44246, DOI: 10.1038/srep44246
- [Patel 2018] Patel, B. A., Gospodarek, A., Larkin, M., Kenrick, S. A., Haverick, M. A., Tugcu, N., Brower, M. A., Richardson, D. D. (2018): *Multi-angle light scattering as a process analytical technology measuring real-time molecular weight for downstream process control*, *mAbs*, 10 (7), 945–950, DOI: 10.1080/19420862.2018.1505178
- [Paul 2019] Paul, K., Rajamanickam, V., Herwig, C. (2019): *Model-based optimization of temperature and pH shift to increase volumetric productivity of a Chinese hamster ovary fed-batch process*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.06.004
- [Platas 2013] Platas, O. B., Sandig, V., Pörtner, R., Zeng, A.-P. (2013): *Evaluation of process parameters in shake flasks for mammalian cell culture*, *BMC Proc*, 7 (Suppl 6), P17, DOI: 10.1186/1753-6561-7-S6-P17
- [Pollock 2013] Pollock, J., Ho, S. V., Farid, S. S. (2013): *Fed-batch and perfusion culture processes: Economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty*, *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (1), 206–219, DOI: 10.1002/bit.24608
- [Pörtner 1996] Pörtner, R., Schäfer, T. (1996): *Modelling hybridoma cell growth and metabolism-a comparison of selected models and data*, *Journal of Biotechnology*, 49 (1-3), 119–135, DOI: 10.1016/0168-1656(96)01535-0
-

- [Pörtner 2017] Pörtner, R., Platas Barradas, O., Frahm, B., Hass, V. C., in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier **2017**
- [Präve 1994] Präve, P. (1994): *Handbook of Biotechnology*. 4, Oldenbourg, Munich
- [Provost 2006] Provost, A., Bastin, G., Agathos, S. N., Schneider, Y. J. (2006): *Metabolic design of macroscopic bioreaction models: Application to Chinese hamster ovary cells*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29 (5-6), 349–366, DOI: 10.1007/s00449-006-0083-y
- [Ramos-de-la-Peña 2019] Ramos-de-la-Peña, A. M., González-Valdez, J., Aguilar, O. (2019): *Protein A chromatography: Challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies*, *Journal of Separation Science*, 42 (9), 1816–1827, DOI: 10.1002/jssc.201800963
- [Ramqvist 2007] Ramqvist, T., Andreasson, K., Dalianis, T. (2007): *Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer*, *Expert opinion on biological therapy*, 7 (7), 997–1007, DOI: 10.1517/14712598.7.7.997
- [Rathore 2018] Rathore, A. S., Kateja, N., Kumar, D. (2018): *Process integration and control in continuous bioprocessing*, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22, 18–25, DOI: 10.1016/j.coche.2018.08.005
- [Reinhart 2015] Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C., Kunert, R. (2015): *Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 4645–4657, DOI: 10.1007/s00253-015-6514-4
- [Repligen Corporation 2018] Repligen Corporation: *XCell™ ATF Brochure*  
<<https://www.repligen.com/technologies/xcell-atf#collapse1-4>>  
(27.08.2018)
- [Rhiel 2002] Rhiel, M., Ducommun, P., Bolzonella, I., Marison, I., Stockar, U. von (2002): *Real-time in situ monitoring of freely suspended and immobilized cell cultures based on mid-infrared spectroscopic measurements*, *Biotechnology and Bioengineering*, 77 (2), 174–185, DOI:
-

- [Rita Costa 2010] Rita Costa, A., Elisa Rodrigues, M., Henriques, M., Azeredo, J., Oliveira, R. (2010): *Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production*, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 74 (2), 127–138, DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.10.002
- [Robert 2009] Robert, F., Bierau, H., Rossi, M., Agugiaro, D., Soranzo, T., Broly, H., Mitchell-Logean, C. (2009): *Degradation of an Fc-fusion recombinant protein by host cell proteases: Identification of a CHO cathepsin D protease*, *Biotechnology and Bioengineering*, 104 (6), 1132–1141, DOI: 10.1002/bit.22494
- [Rosa 2009] Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., Ferreira, I. F., Sommerfeld, S., Bäcker, W., Aires-Barros, M. R. (2009): *Downstream processing of antibodies: single-stage versus multi-stage aqueous two-phase extraction*, *Journal of chromatography. A*, 1216 (50), 8741–8749, DOI: 10.1016/j.chroma.2009.02.024
- [Rosa 2010] Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Azevedo, A. M., Aires-Barros, M. R. (2010): *Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals*, *Journal of chromatography. A*, 1217 (16), 2296–2305, DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.034
- [Rosa 2013] Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., Sommerfeld, S., Mutter, M., Bäcker, W., Aires-Barros, M. R. (2013): *Continuous purification of antibodies from cell culture supernatant with aqueous two-phase systems: From concept to process*, *Biotechnology Journal*, 8 (3), 352–362, DOI: 10.1002/biot.201200031
- [Rosen 2015] Rosen, R., Wichert, G. von, Lo, G., Bettenhausen, K. D. (2015): *About The Importance of Autonomy and Digital Twins for the Future of Manufacturing*, *IFAC-PapersOnLine*, 48 (3), 567–572, DOI: 10.1016/j.ifacol.2015.06.141

- [Ryder 2018]                      Ryder, A. G. (2018): *Cell culture media analysis using rapid spectroscopic methods*, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22, 11–17, DOI: 10.1016/j.coche.2018.08.008
- [Sagmeister 2013]                Sagmeister, P., Wechselberger, P., Jazini, M., Meitz, A., Langemann, T., Herwig, C. (2013): *Soft sensor assisted dynamic bioprocess control: Efficient tools for bioprocess development*, *Chemical Engineering Science*, 96, 190–198, DOI: 10.1016/j.ces.2013.02.069
- [Schelden 2017]                Schelden, M., Lima, W., Doerr, E. W., Wunderlich, M., Rehmann, L., Buchs, J., Regestein, L. (2017): *Online measurement of viscosity for biological systems in stirred tank bioreactors*, *Biotechnology and Bioengineering*, 114 (5), 990–997, DOI: 10.1002/bit.26219
- [Schmidt 2017]                Schmidt, A., Richter, M., Rudolph, F., Strube, J. (2017): *Integration of Aqueous Two-Phase Extraction as Cell Harvest and Capture Operation in the Manufacturing Process of Monoclonal Antibodies*, *Antibodies*, 6 (4), 21, DOI: 10.3390/antib6040021
- [Schmidt 2019]                Schmidt, A., Strube, J. (2019): *Distinct and Quantitative Validation Method for Predictive Process Modeling with Examples of Liquid-Liquid Extraction Processes of Complex Feed Mixtures*, *Processes*, 7 (5), 298, DOI: 10.3390/pr7050298
- [Schulte 2000]                Schulte, M., Britsch, L., Strube, J. (2000): *Continuous preparative liquid chromatography in the downstream processing of biotechnological products*, *Acta Biotechnologica*, 20 (1), 3–15, DOI: 10.1002/abio.370200102
- [Selișteanu 2015]                Selișteanu, D., Șendrescu, D., Georgeanu, V., Roman, M. (2015): *Mammalian Cell Culture Process for Monoclonal Antibody Production: Nonlinear Modelling and Parameter Estimation*, *BioMed Research International*, 2015, DOI: 10.1155/2015/598721
- [Sethuraman 2004]                Sethuraman, R., Lee, T. L., Tachibana, S. (2004): *Simple quantitative HPLC method for measuring physiologic amino acids in cerebrospinal*

- fluid without pretreatment, Clinical chemistry*, 50 (3), 665–669, DOI: 10.1373/clinchem.2003.026195
- [Sha 2016] Sha, S., Agarabi, C., Brorson, K., Lee, D.-Y., Yoon, S. (2016): *N-Glycosylation Design and Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies*, *Trends in Biotechnology*, 34 (10), 835–846, DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.02.013
- [Sheikholeslami 2014] Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., Henry, O. (2014): *Elucidating the effects of postinduction glutamine feeding on the growth and productivity of CHO cells*, *Biotechnology Progress*, 30 (3), 535–546, DOI: 10.1002/btpr.1907
- [Shukla 2007] Shukla, A. A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S., Low, D. (2007): *Downstream processing of monoclonal antibodies-Application of platform approaches*, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 848 (1), 28–39, DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.09.026
- [Shukla 2010] Shukla, A. A., Thömmes, J. (2010): *Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins*, *Trends in Biotechnology*, 28 (5), 253–261, DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.02.001
- [Sikora 2015] Sikora, T., in *Dietary Supplements: Safety, Efficacy and Quality*, Woodhead Publ. series in food science, technology and nutrition, Vol. 267 (Eds: K. Berginc, S. Kreft), Woodhead Pub Ltd. Amsterdam **2015**
- [Singh 2016] Singh, N., Arunkumar, A., Chollangi, S., Tan, Z. G., Borys, M., Li, Z. J. (2016): *Clarification technologies for monoclonal antibody manufacturing processes: Current state and future perspectives*, *Biotechnology and Bioengineering*, 113 (4), 698–716, DOI: 10.1002/bit.25810
- [Sixt 2018] Sixt, M., Uhlenbrock, L., Strube, J. (2018): *Toward a Distinct and Quantitative Validation Method for Predictive Process Modelling—On*



- the Example of Solid-Liquid Extraction Processes of Complex Plant Extracts, Processes*, 6 (6), 66, DOI: 10.3390/pr6060066
- [Sommeregger 2017] Sommeregger, W., Sissolak, B., Kandra, K., Stosch, M. von, Mayer, M., Striedner, G. (2017): *Quality by control: Towards model predictive control of mammalian cell culture bioprocesses*, *Biotechnology Journal*, 12 (7), DOI: 10.1002/biot.201600546
- [Sommerfeld 2005] Sommerfeld, S., Strube, J. (2005): *Challenges in biotechnology production - Generic processes and process optimization for monoclonal antibodies*, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44 (10), 1123–1137, DOI: 10.1016/j.cep.2005.03.006
- [Stanfield 2014] Stanfield, R. L. (2014): *Determination of antibody structures*, *Methods Mol Biol*, 1131, 395–406, DOI: 10.1007/978-1-62703-992-5\_23
- [Steinwandter 2018] Steinwandter, V., Šišmiš, M., Sagmeister, P., Bodenhofer, U., Herwig, C. (2018): *Multivariate analytics of chromatographic data: Visual computing based on moving window factor models*, *Journal of Chromatography B*, 1092, 179–190, DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.06.010
- [Stelzer 2017] Stelzer, I. V., Kager, J., Herwig, C., in *Computer Aided Chemical Engineering 27 European Symposium on Computer Aided Process Engineering*, Vol. 40 (Eds: A. Espuña, M. Graells, L. Puigjaner), Elsevier **2017**
- [Strube 1998] Strube, J., Schmidtraub, H., Schulte, M. (1998): *Auslegung, Betrieb und ökonomische Betrachtung chromatographischer Trennprozesse*, *Chemie Ingenieur Technik*, 70 (10), 1271–1279, DOI: 10.1002/cite.330701006
- [Strube 2000] Strube, J. (2000): *Technische Chromatographie: Auslegung, Optimierung, Betrieb und Wirtschaftlichkeit*, *Berichte aus der Verfahrenstechnik*, Shaker, Aachen

- [Strube 2007] Strube, J., Sommerfeld, S., Lohrmann, M., in *Bioseparation and Bioprocessing*, Vol. 2 (Eds: G. Subramanian), Wiley-VCH. Weinheim, Germany **2007**
- [Strube 2012] Strube, J. (2012): *Prädiktive Modellierung von Trennverfahren*, *Chemie Ingenieur Technik*, 84 (6), 867, DOI: 10.1002/cite.201290051
- [Strube 2018] Strube, J., Ditz, R., Kornecki, M., Huter, M., Schmidt, A., Thiess, H., Zobel-Roos, S. (2018): *Process intensification in biologics manufacturing*, *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 133, 278–293, DOI: 10.1016/j.cep.2018.09.022
- [Suttle, A., Sha, M. 2018] Suttle, A., Sha, M.: *CHO Cell Culture in Eppendorf BioBLU® 10c Single-Use Vessels* <<https://www.eppendorf.com/DE-de/anwendungen/physiocare/medien/application-notes/>> (03.07.2019)
- [Tait 2012] Tait, A. S., Hogwood, C. E. M., Smales, C. M., Bracewell, D. G. (2012): *Host cell protein dynamics in the supernatant of a mAb producing CHO cell line*, *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (4), 971–982, DOI: 10.1002/bit.24383
- [Tapia 2016] Tapia, F., Vázquez-Ramírez, D., Genzel, Y., Reichl, U. (2016): *Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivations: options for process intensification in cell culture-based viral vaccine production*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2121–2132, DOI: 10.1007/s00253-015-7267-9
- [Tarrant 2012] Tarrant, R. D. R., Velez-Suberbie, M. L., Tait, A. S., Smales, C. M., Bracewell, D. G. (2012): *Host cell protein adsorption characteristics during protein A chromatography*, *Biotechnology Progress*, 28 (4), 1037–1044, DOI: 10.1002/btpr.1581
- [Teixeira 2007] Teixeira, A. P., Alves, C., Alves, P. M., Carrondo, M. J. T., Oliveira, R. (2007): *Hybrid elementary flux analysis/nonparametric modeling: application for bioprocess control*, *BMC Bioinformatics*, 8 (1), 30, DOI: 10.1186/1471-2105-8-30

- [Teixeira 2009] Teixeira, A. P., Oliveira, R., Alves, P. M., Carrondo, M. J. T. (2009): *Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures*, *Biotechnology Advances*, 27 (6), 726–732, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.05.003
- [Templeton 2013] Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., Young, J. D. (2013): *Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture*, *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (7), 2013–2024, DOI: 10.1002/bit.24858
- [Thiess 2017a] Thiess, H., Zobel-Roos, S., Gronemeyer, P., Ditz, R., Strube, J., in *Continuous Biomanufacturing - Innovative Technologies and Methods*, Vol. 213 (Eds: G. Subramanian), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany **2017**
- [Thiess 2017b] Thiess, H., Leuthold, M., Grummert, U., Strube, J. (2017): *Module design for ultrafiltration in biotechnology: Hydraulic analysis and statistical modeling*, *Journal of Membrane Science*, 540, 440–453, DOI: 10.1016/j.memsci.2017.06.038
- [Tosoh Bioscience LLC 2019] Tosoh Bioscience LLC: *TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F* <[https://www.separations.us.tosohbioscience.com/Process\\_Media/id-7014/TOYOPEARL\\_AF-rProtein\\_A\\_HC-650F](https://www.separations.us.tosohbioscience.com/Process_Media/id-7014/TOYOPEARL_AF-rProtein_A_HC-650F)> (29.06.2019)
- [Uhlenbrock 2017] Uhlenbrock, L., Sixt, M., Strube, J. (2017): *Quality-by-Design (QbD) process evaluation for phytopharmaceuticals on the example of 10-deacetylbaicatin III from yew*, *Resource-Efficient Technologies*, 3 (2), 137–143, DOI: 10.1016/j.reffit.2017.03.001
- [Valente 2015] Valente, K. N., Lenhoff, A. M., Lee, K. H. (2015): *Expression of difficult-to-remove host cell protein impurities during extended Chinese hamster ovary cell culture and their impact on continuous bioprocessing*, *Biotechnology and Bioengineering*, 112 (6), 1232–1242, DOI: 10.1002/bit.25515
- [Vande Wouwer 2004] Vande Wouwer, A., Renotte, C., Bogaerts, P. (2004): *Biological reaction modeling using radial basis function networks*, *Computers &*
-

- Chemical Engineering*, 28 (11), 2157–2164, DOI: 10.1016/j.compchemeng.2004.03.003
- [Wagner 2015] Wagner, R. (2015): *Animal cell biotechnology, In biologics production*, De Gruyter, Berlin
- [Wahrheit 2014] Wahrheit, J., Nicolae, A., Heinzle, E. (2014): *Dynamics of growth and metabolism controlled by glutamine availability in Chinese hamster ovary cells*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (4), 1771–1783, DOI: 10.1007/s00253-013-5452-2
- [Wang 2009] Wang, X., Hunter, A. K., Mozier, N. M. (2009): *Host cell proteins in biologics development: Identification, quantitation and risk assessment*, *Biotechnology and Bioengineering*, 103 (3), 446–458, DOI: 10.1002/bit.22304
- [Wang 2016] Wang, Y., Li, X., Liu, Y.-H., Richardson, D., Li, H., Shameem, M., Yang, X. (2016): *Simultaneous monitoring of oxidation, deamidation, isomerization, and glycosylation of monoclonal antibodies by liquid chromatography-mass spectrometry method with ultrafast tryptic digestion*, *mAbs*, 8 (8), 1477–1486, DOI: 10.1080/19420862.2016.1226715
- [Warikoo 2012] Warikoo, V., Godawat, R., Brower, K., Jain, S., Cummings, D., Simons, E., Johnson, T., Walther, J., Yu, M., Wright, B., McLarty, J., Karey, K. P., Hwang, C., Zhou, W., Riske, F., Konstantinov, K. (2012): *Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins*, *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (12), 3018–3029, DOI: 10.1002/bit.24584
- [Warnock 2006] Warnock, J. N., Merten, O.-W., Al-Rubeai, M. (2006): *Cell culture processes for the production of viral vectors for gene therapy purposes*, *Cytotechnology*, 50 (1-3), 141–162, DOI: 10.1007/s10616-005-5507-z
- [Waugh 2005] Waugh, D. S. (2005): *Making the most of affinity tags*, *Trends in Biotechnology*, 23 (6), 316–320, DOI: 10.1016/j.tibtech.2005.03.012

- [Wechselberger 2010] Wechselberger, P., Seifert, A., Herwig, C. (2010): *PAT method to gather bioprocess parameters in real-time using simple input variables and first principle relationships*, *Chemical Engineering Science*, 65 (21), 5734–5746, DOI: 10.1016/j.ces.2010.05.002
- [Weichert 2013] Weichert, H., Becker, M. (2013): *Online glucose-lactate monitoring and control in cell culture and microbial fermentation bioprocesses*, *BMC Proceedings*, 7 (Suppl 6), P18, DOI: 10.1186/1753-6561-7-S6-P18
- [Wiesel 2003] Wiesel, A., Schmidt-Traub, H., Lenz, J., Strube, J. (2003): *Modelling gradient elution of bioactive multicomponent systems in non-linear ion-exchange chromatography*, *Journal of Chromatography A*, 1006 (1-2), 101–120, DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00554-5
- [Winckler 2014] Winckler, S., Krueger, R., Schnitzler, T., Zang, W., Fischer, R., Biselli, M. (2014): *A sensitive monitoring system for mammalian cell cultivation processes: a PAT approach*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37 (5), 901–912, DOI: 10.1007/s00449-013-1062-8
- [Wink 2011] Wink, M. (2011): *Molekulare Biotechnologie, Konzepte, Methoden und Anwendungen*. 2., aktualisierte Aufl., Wiley-VCH, Weinheim
- [Woodcock 2014] Woodcock, J. (2014): *Modernizing Pharmaceutical Manufacturing – Continuous Manufacturing as a Key Enabler*
- [Wurm 2004] Wurm, F. M. (2004): *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*, *Nat Biotechnol*, 22 (11), 1393–1398, DOI: 10.1038/nbt1026
- [Xing 2008] Xing, Z., Li, Z., Chow, V., Lee, S. S. (2008): *Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods*, *Biotechnology Progress*, 24 (3), 675–683, DOI: 10.1021/bp070466m
- [Xing 2010] Xing, Z., Bishop, N., Leister, K., Li, Z. J. (2010): *Modeling kinetics of a large-scale fed-batch CHO cell culture by Markov chain Monte Carlo method*, *Biotechnology Progress*, 26 (1), 208–219, DOI: 10.1002/btpr.284
-

- [Yamamoto 1983] Yamamoto, S., Nakanishi, K., Matsuno, R., Kamikubo, T. (1983): *Ion exchange chromatography of proteins??prediction of elution curves and operating conditions. I. Theoretical considerations, Biotechnology and Bioengineering*, 25 (6), 1465–1483, DOI: 10.1002/bit.260250605
- [Zhang 2010] Zhang, H., Wang, W., Quan, C., Fan, S. (2010): *Engineering Considerations for Process Development in Mammalian Cell Cultivation, Current pharmaceutical biotechnology*, 11, 103–112, DOI: 10.2174/138920110790725320
- [Zhao 2015] Zhao, N., Wu, Z.-s., Zhang, Q., Shi, X.-y., Ma, Q., Qiao, Y.-j. (2015): *Optimization of Parameter Selection for Partial Least Squares Model Development, Scientific reports*, 5, 11647, DOI: 10.1038/srep11647
- [Zobel 2014] Zobel, S., Helling, C., Ditz, R., Strube, J. (2014): *Design and operation of continuous countercurrent chromatography in biotechnological production, Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53 (22), 9169–9185, DOI: 10.1021/ie403103c
- [Zobel-Roos 2017] Zobel-Roos, S., Mouellef, M., Siemers, C., Strube, J. (2017): *Process Analytical Approach towards Quality Controlled Process Automation for the Downstream of Protein Mixtures by Inline Concentration Measurements Based on Ultraviolet/Visible Light (UV/VIS) Spectral Analysis, Antibodies*, 6 (4), 24, DOI: 10.3390/antib6040024
- [Zobel-Roos 2018] Zobel-Roos, S., Stein, D., Strube, J. (2018): *Evaluation of Continuous Membrane Chromatography Concepts with an Enhanced Process Simulation Approach, Antibodies*, 7 (1), 13, DOI: 10.3390/antib7010013
- [Zobel-Roos 2019] Zobel-Roos, S., Schmidt, A., Mestmäcker, F., Mouellef, M., Huter, M., Uhlenbrock, L., Kornecki, M., Lohmann, L., Ditz, R., Strube, J. (2019): *Accelerating Biologics Manufacturing by Modeling or: Is Approval under the QbD and PAT Approaches Demanded by Authorities Acceptable without a Digital-Twin?, Processes*, 7 (2), 94, DOI: 10.3390/pr7020094
-

## 7. Symbolverzeichnis

### 7.1. Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
AEX	Anionenaustauschchromatographie (engl. Anion Exchange Chromatography)
APC	Advanced Process Control
ATF	Alternierender Tangentialfluss (engl. Alternating Tangential Flow)
ATPE	Wässrige Zweiphasenextraktion (engl. Aqueous Two-Phase Extraction)
ATPS	Wässrige Zweiphasensystem (engl. Aqueous Two-Phase System)
ATR-FTIR	Abgeschwächte Totalreflexion Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (engl. Attenuated Total Reflection Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)
CAPEX	Investitionsausgaben (engl. Capital Expenditure)
CBP	Kontinuierliche Bioprozesse (engl. Continuous Bioprocessing)
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
CEX	Kationenaustauschchromatographie (engl. Cation Exchange Chromatography)
CHO	Eierstöcke des chinesischen Hamsters (engl. Chinese Hamster Ovary)
CPP	Kritische Prozessparameter (engl. Critical Process Parameters)
CQA	Kritische Qualitätsattribute (engl. Critical Quality Attributes)
DF	Diafiltration
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DoE	Design of Experiments
DSP	Downstream Processing
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FMEA	Failure Mode and Effects Analysis
GMP	Good Manufacturing Practice
HCP	Wirtszellproteine (engl. Host Cell Proteins)
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie (engl. Hydrophobic Interaction Chromatography)
HPLC	Hochleistungschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography)
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauschchromatographie (engl. Ion Exchange Chromatography)
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
Konz	Konzentration
LLE	Flüssig-flüssig Extraktion (engl. Liquid Liquid Extraction)
mAb	Monoklonaler Antikörper (engl. Monoclonal Antibody)
MF	Mikrofiltration
Mrd	Milliarde
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (engl. Molecular Weight)
NK	Nebenkomponten
NP	Normalphasenchromatographie (engl. Normal Phase Chromatography)
NS0	Murines Myelom

Abkürzung	Beschreibung
OPEX	Betriebsausgaben (engl. Operational Expenditure)
PAT	Process Analytical Technology
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
PMMA	Polymethylmethacrylat
PVE	Polyvinylether
QbD	Quality-by-Design
QTTP	Quality Target Product Profile
R	Rest
RP	Umkehrphasenchromatographie (engl. Reversed Phase Chromatography)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. Revolutions Per Minute)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl. Size-Exclusion-Chromatography)
SF	Sterilfiltration
SP2/0	Murines Myelom
STR	Rührkessel (engl. Stirred Tank Reactor)
T	Temperatur
UF	Ultrafiltration
USP	Upstream Processing
UV	Ultraviolette Strahlung
VF	Virusfiltration
VI	Virusinaktivierung
WK	Weniger kritische Nebenkompenten



## 7.2. Parameter

Parameter	Beschreibung	Einheit
$\mu_{\max}$	Maximale Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$a_1$	Koeffizient für $\text{mgln}$	$10^{-12} \text{ mmol Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$a_2$	Koeffizient für $\text{mgln}$	$\text{mM}$
$\text{AMM}_{\text{start}}$	Ammoniumkonzentration zu Beginn	$\text{mM}$
$\text{GLC}_{\text{start}}$	Glucosekonzentration zu Beginn	$\text{mM}$
$\text{GLN}_{\text{start}}$	Glutaminkonzentration zu Beginn	$\text{mM}$
$k_d$	Maximale Sterberate	$\text{h}^{-1}$
$\text{KD}_{\text{amm}}$	Monod-Konstante Ammonium für Sterbephase	$\text{mM}$
$\text{KD}_{\text{lac}}$	Monod-Konstante Lactat für Sterbephase	$\text{mM}$
$K_{\text{glc}}$	Monod-Konstante Glucose	$\text{mM}$
$K_{\text{gln}}$	Monod-Konstante Glutamin	$\text{mM}$
$\text{KI}_{\text{amm}}$	Monod-Konstante Ammonium für Inhibierung	$\text{mM}$
$\text{KI}_{\text{lac}}$	Monod-Konstante Lactat für Inhibierung	$\text{mM}$
$\text{LAC}_{\text{start}}$	Lactatkonzentration zu Beginn	$\text{mM}$
$m_{\text{glc}}$	Koeffizient Erhaltungsstoffwechsel Glucose	$10^{-12} \text{ mmol Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$Q_{\text{mAb}}$	Spezifische Produktbildungsrate	$10^{-12} \text{ g}_{\text{Produkt}} \text{ Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$r_{\text{amm}}$	Abbaurate Ammonium	$10^{-12} \text{ mmol Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$X_{V,\text{start}}$	Viable Zellzahlkonz. Inokulum	$10^6 \text{ Zellen mL}^{-1}$
$Y_{\text{amm/gln}}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Ammonium zu verbrauchtem Glutamin	$\text{mmol mmol}^{-1}$
$Y_{\text{lac/glc}}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Lactat zu verbrauchter Glucose	$\text{mmol mmol}^{-1}$
$Y_{X/\text{glc}}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchter Glucose	$10^9 \text{ Zellen mmol}^{-1}$
$Y_{X/\text{gln}}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchtem Glutamin	$10^9 \text{ Zellen mmol}^{-1}$

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des plattformbasierten Herstellungsprozesses monoklonaler Antikörper nach Sommerfeld [2005]. DF, Diafiltration; VI, Virusinaktivierung; UF, Ultrafiltration; MF, Mikrofiltration; IEX, Ionenaustauschchromatographie; HIC, hydrophobe Interaktionschromatographie; SF, Sterilfiltration. ....	5
Abbildung 2: Korrelationen zwischen Prozess-, Status- und Zielvariablen. In dem betrachteten System sind Variablen online (grün), offline (rot) und via Software-basierten Sensoren und Prozessmodellen (blau) online mess- und kontrollierbar, nach Kornecki [2018b] und Präve [1994]. ....	26
Abbildung 3: Methoden für die Entwicklung makroskopischer kinetischer Modelle nach Ben Yahia [2015]. PCA, Hauptkomponentenanalyse; MFA, Analyse des metabolischen Flux; EFM, Verfahren des elementaren Flux; NN, neurale Netzwerke. ....	29
Abbildung 4: Übersichtsdarstellung des betrachteten Prozesses inklusive des USP-DSP-Integrationsansatzes.....	33
Abbildung 5: Korrelation zwischen der offline bestimmten totalen Zellzahlkonzentration ( $10^5$ Zellen $\text{mL}^{-1}$ ) und der online gemessenen Trübung (880 nm, FAU). Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration als auch den Messfehler der Trübungssonde (0,75 %). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Beziehung beträgt 0,993. ....	45
Abbildung 6: Korrelation zwischen der offline bestimmten viablen Zellzahlkonzentration ( $10^5$ Zellen $\text{mL}^{-1}$ ) und der online gemessenen Trübung (880 nm, FAU) vor (schwarz) und nach (grau) 234 h Kultivierung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration als auch den Messfehler der Trübungssonde (0,75 %). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Beziehung beträgt bis 234 h Kultivierung 0,987.....	45
Abbildung 7: Der mit Hilfe der optischen Dichte (Trübung bei 880 nm) aufgenommene Inokulationszeitpunkt der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 in Suspension.....	46
Abbildung 8: Beispielhafte Spektraldaten der Raman-Spektroskopie im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 in Suspension. ....	47

Abbildung 9: <i>Ex-situ</i> Messung des Raman-Shifts der Biosuspension im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG 44. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration als auch den Fehler der PLS-Regression ( $RMSE \leq 13,82 \cdot 10^5$ Zellen $mL^{-1}$ )....	48
Abbildung 10: Verlauf der viablen und totalen Zellzahlkonzentration nach PLS-Regression und Trübungsmessung im Vergleich zu der offline gemessenen viablen Zellzahlkonzentration. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration als auch den Fehler der PLS-Regression ( $RMSE \leq 13,82 \cdot 10^5$ Zellen $mL^{-1}$ ).....	49
Abbildung 11: Leitfähigkeit und Zellviabilität im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG 44 in Suspension. Die horizontale Linie spiegelt den arithmetischen Mittelwert der Leitfähigkeit bei hoher Zellviabilität (> 90 %) wider. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Viabilität als auch den Messfehler der Leitfähigkeitssonde (3 %). ....	50
Abbildung 12: Schematischer Überblick über die verwendete kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückhaltung (Perfusion) und die Kontrollstrategie mit Hilfe einer in-situ Trübungssonde, Zufuhr-, Filtrat- und Bleedpumpe. ....	51
Abbildung 13: Lineare Korrelation ( $R^2 \geq 0,98$ ) der viablen Zellzahlkonzentration und Trübung inklusive der zwei Betriebspunkte (links) und der Regressionsgleichung sowie der Verlauf der Trübung über die kontinuierliche Kultivierung (rechts). Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration (links). Die graue Umhüllungskurve repräsentiert den Messfehler der Trübungssonde (0,75 %, rechts). ....	51
Abbildung 14: Vergleich der viablen Zellzahlkonzentration mittels Offlineanalyse und online Trübungsmessung (links). Detaillierte Betrachtung der zwei Betriebspunkte nach 150 h Kultivierung (rechts). Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration. Die graue Umhüllungskurve repräsentiert den fortgepflanzten Fehler basierend auf dem Messfehler der Sonde (0,75 %) und dem Fehler der linearen Regression aus Abbildung 13.....	52
Abbildung 15: Offline bestimmte, viable Zellzahlkonzentration und -viabilität (links) als auch online gemessene Trübung (rechts) im Verlauf einer kontinuierlichen Kultivierung, eingeteilt in die Batch-, Anfahr- und stationäre Phase. Die horizontale Linie gibt den arithmetischen Mittelwert der viablen Zellzahlkonzentration ( $24,30 \pm 1,96 \cdot 10^6$ Zellen $mL^{-1}$ ) während der	

stationären Phase an. Die Fehlerbalken repräsentieren die offline Zweifachbestimmung der Zellzahlkonzentration und -viabilität.....	53
Abbildung 16: Leitfähigkeit und Zellviabilität im Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung von CHO DG44 in Suspension. Die horizontale Linie spiegelt den arithmetischen Mittelwert der Leitfähigkeit wider. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Viabilität als auch den Messfehler der Leitfähigkeitssonde (3 %). ....	54
Abbildung 17: Verlauf der Modellvariablen (rot) der viablen Zellzahl-, Antikörper-, Glucose-, Lactat- und Ammoniumkonzentration im Vergleich zu den experimentellen Prozessvariablen (schwarz). Die Fehlerbalken repräsentieren die experimentelle offline Bestimmung der Prozessvariablen von drei Fed-Batch Kultivierungen. ....	57
Abbildung 18: Lineare Regression der experimentell und modellbasierten viablen Zellzahl- ( $R^2 \geq 0,98$ ), Glucose- ( $R^2 \geq 0,97$ ), Antikörper- ( $R^2 \geq 0,99$ ) Lactatkonzentration ( $R^2 \geq 0,92$ ). Die Fehlerbalken repräsentieren die experimentelle offline Bestimmung der Prozessvariablen von drei Fed-Batch Kultivierungen. ....	58
Abbildung 19: Variation der maximalen Wachstumsrate $\mu_{\max}$ ( $\pm 10 \% \mu_{\max}$ ) und deren Einfluss auf die Modellvariablen. ....	59
Abbildung 20: Paretodigramm der standardisierten Effekte für die einzelnen Modellparameter basierend auf deren Einfluss auf die Modellvariablen maximale viable Zellzahlkonzentration (links) und maximale Antikörperkonzentration (rechts). Die vertikale, rote Linie repräsentiert die Referenzlinie für die statistische Signifikanz (hier jeweils 1,98 für beide Modellvariablen). Das Signifikanzniveau $\alpha$ beträgt 0,05. 1, Lag-Phase; 2, exponentielle Phase; 3, stationäre Phase; 4, Sterbephase.....	60
Abbildung 21: Beispiele der gleichverteilten Modellparameter, die aus 100 Monte-Carlo-Simulationen resultieren, bei denen jeder Parameter innerhalb des jeweiligen experimentellen Parameterfehlers variiert wurde. Die horizontale rote Linie repräsentiert den arithmetischen Mittelwert jedes Parameters.....	62
Abbildung 22: Umhüllungskurven für jede Prozessvariable basierend auf 100 Monte-Carlo-Simulationen durch die Variation der Modellparameter innerhalb ihrer Modellparameterfehler.	

Die schwarzen Quadrate und Fehlerbalken repräsentieren die experimentelle Dreifachbestimmung der jeweiligen Prozessvariable. Für eine bessere Übersichtlichkeit und Visualisierung wurde die Umhüllungskurve für Glucose nach 72 h Kultivierung als Konzentrationswerte vor der jeweiligen Zufütterung dargestellt. Der detaillierte Verlauf der Glucosekonzentration zwischen den Zufütterungen ist in Abbildung 19 zu sehen.....	63
Abbildung 23: Wertung (links) und Gewichtung (rechts) der PLS-Regression für die maximale viable Zellzahlkonzentration $X_{v,max}$ , maximale Antikörperkonzentration $mAb_{max}$ und maximale Glucosekonzentration $GLC_{max}$ als Antwort (Modellergebnis, rot) basierend auf dem Einfluss der Prädiktoren (Modellparameter, blau). Die Ergebnisse der Wertung der PLS-Regression (links) sind nach $X_{v,max}$ gruppiert, um den Einfluss von $\mu_{max}$ (Zahlenwerte) zu visualisieren.....	65
Abbildung 24: Lineare Regression der offline gemessenen Glucose- (links) als auch Lactatkonzentrationen (rechts) mit der Voraussage der jeweiligen Prozessvariable durch die Integration der online gemessenen Trübung in das Prozessmodell. Die Fehlerbalken repräsentieren die experimentelle Zweifachbestimmung der Prozessvariablen. ....	66
Abbildung 25: Schematische Prozessstruktur zur Regelung der durch die Kombination der experimentellen Daten mit dem makroskopischen Modell vorausgesagten Prozessvariablen. Die Struktur basiert auf einer speicherprogrammierbaren Steuerung (SPS), die über einen OPC-Server (engl. Open Platform Communications) mit dem Bioreaktor und dessen DCU (Digital Control Unit) verbunden ist.....	67
Abbildung 26: Validierung der Linearität des Kombinationsstandards inklusive der Bestimmtheitsmaße. ....	68
Abbildung 27: Chromatogramm des Kombinationsstandards in drei Verdünnungen (1,25; 5; 20). ....	69
Abbildung 28: Metabolisches Netzwerk für CHO nach Ahn [2011]. ....	71
Abbildung 29: Übersicht der Produktkonzentration aller Versuche mit integriertem Center Point (CP). Die Gestrichelte Linie gibt den arithmetischen Mittelwert der drei Center Points an. Die Versuche 3, 11 und 14 sind die Center Points, welche unter Angabe der Standardabweichung, zusammengefasst sind. ....	73
Abbildung 30: Prozentuale Abweichung der Zielgröße Produktkonzentration vom Center Point. ....	73

Abbildung 31: Verteilung der Versuchsdaten über die Zielgröße Produktkonzentration. ....	74
Abbildung 32: Signifikanzen der Versuchskombination der Aminosäuren Glutamat, Histidin, Methionin und Tyrosin. ....	75
Abbildung 33: Statistisches Parameterscreening zur Feststellung der signifikanten Parameter und Kombinationen im DoE. ....	76
Abbildung 34: Übersicht der Modellgüte, der Validierung und des Signifikanzwertes P. ....	76
Abbildung 35: Varianzanalyse des erzeugten statistischen Modells für die Zielgröße Produktkonzentration. ....	77
Abbildung 36: Beurteilung der Residuen zur Einschätzung von systematischen und statistischen Fehlern des statistischen Modells. ....	77
Abbildung 37: Vorhersageanalyse mit Sensitivitätsanalyse (Dreieck). ....	78
Abbildung 38: Wechselwirkungsanalyse der einzelnen Aminosäuren (links). Wirkungsflächenanalyse des statistischen Modells zur Beschreibung des Effektes zwischen Glutamat und Tyrosin (rechts). ....	79
Abbildung 39: Viable Zellzahlkonzentration und Zellviabilität während drei Fed-Batch (links) und einer kontinuierlichen Kultivierung (rechts). Die Fehlerbalken repräsentieren drei Fed-Batch Kultivierungen beziehungsweise die Zweifachbestimmung der Prozessvariablen während der Perfusion. BP, Betriebspunkt. ....	80
Abbildung 40: Glucose- und Lactatkonzentration während drei Fed-Batch (links) und einer kontinuierlichen Kultivierung (rechts). Die Fehlerbalken repräsentieren drei Fed-Batch Kultivierungen beziehungsweise die Zweifachbestimmung der Prozessvariablen während der Perfusion. BP, Betriebspunkt. ....	81
Abbildung 41: SEC Chromatogramme der zellfreien Lösung des Fed-Batch (schwarz) und kontinuierlichen (rot) Prozesses. HMW, hochmolekulare Verunreinigungen; P, Produkt; SC, Nebenkomponenten; LMW, niedermolekulare Verunreinigungen. ....	83

Abbildung 42: SEC Chromatogramme im Verlauf des Fed-Batch Prozesses über eine Kultivierungszeit von 293 h. ....	84
Abbildung 43: Verlauf der Produktkonzentration und SEC-basierter Produktreinheit im Verlauf des Fed-Batch Prozesses über eine Kultivierungszeit von 293 h. Die Fehlerbalken repräsentieren die Zweifachbestimmung der Prozessvariablen. ....	85
Abbildung 44: 2D-Gelelektrophorese der zellfreien Kultivierungslösung einer CHO DG44 Fed-Batch Kultivierung inklusive der Klassifizierung für die Abtrennung der NebenkompONENTEN (oben) und die durch LC-MS/MS Analysen identifizierte NebenkompONENTEN inklusive ihrer physikochemischen Eigenschaften (unten). ....	86
Abbildung 45: IEX Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung (- -) und der diafiltrierten leichten Phase nach der ATPE (-). ....	88
Abbildung 46: SEC Chromatogramme der Fraktionen aus Abbildung 45 der zellfreien Kultivierungslösung (links) und der diafiltrierten leichten Phase nach der ATPE (rechts). HMW, hochmolekulare Verunreinigungen; P, Produkt; SC, NebenkompONENTEN; LMW, niedermolekulare Verunreinigungen. ....	89
Abbildung 47: SEC Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung (- -), der diafiltrierten zellfreien Kultivierungslösung (-), der leichten Phase nach der ATPE (- -) und die diafiltrierte leichte Phase nach der ATPE (-). HMW, hochmolekulare Verunreinigungen; P, Produkt; SC, NebenkompONENTEN; LMW, niedermolekulare Verunreinigungen. ....	90
Abbildung 48: HIC Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung (- -) und der diafiltrierten leichten Phase nach der ATPE (-). ....	90
Abbildung 49: IEX Chromatogramme der zellfreien Kultivierungslösung (links oben) mit pH-Gradient und der daraus resultierenden SEC Chromatogramme der IEX-FrakTIONEN. WK, weniger kritisch. ....	92
Abbildung 50: ATR-FTIR Analysen des monoklonalen Antikörpers. Transmissionsspektrum (links) und dessen zweite Ableitung (rechts). ....	94

Abbildung 51: ATR-FTIR Spektren von IgG, welches thermisch (links, 40 °C, 12 h) und enzymatisch via PNGase F (rechts, 24 h) denaturiert wurde.....	94
--	----

Abbildung 52: ATR-FTIR Spektren des IgG nach 288 h Fed-Batch (schwarz) und kontinuierlicher (rot) Kultivierung.....	95
---	----

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Strategien für die Medienentwicklung nach Fletcher [2005]. .....	9
---	---

Tabelle 2: Physikochemische Eigenschaften der wichtigsten Klassen von Nebenkomponten, die während der Produktion von Biopharmazeutika entstehen können, nach [Singh 2016]. pI, isoelektrischer Punkt; MW, Molekulargewicht; HCPs, host cell proteins, Wirtszellproteine; DNA, Desoxyribonukleinsäure.....	13
---	----

Tabelle 3: Produktspezifische CQAs von monoklonalen Antikörpern und ausgewählte analytische Methoden für deren Charakterisierung. MALS, multiangle light scattering; 2D-GE, zweidimensionale Gelelektrophorese; MS, Massenspektrometrie; cIEF, kapillare isoelektrische Fokussierung; HILIC, hydrophile Interaktionschromatographie; RP-HPLC, Umkehrphasenchromatographie; CD, Circular dichroismus; FTIR, Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie.....	22
---	----

Tabelle 4: Physikalische, chemische und biologische Variablen und deren korrespondierendes Sensorsystem. Die Fähigkeit diese zur Onlinekontrollstrategie zu verwenden, basiert auf: -, keine; +, nicht direkt anwendbar (nur in Kombination mit Prozessmodellen, Chemometrie, etc.); -/+, abhängig von der untersuchten Variablen; ++, direkt anwendbar.....	24
--	----

Tabelle 5: Beispielhafter Überblick über spektroskopische Methoden, die Prozessvariablen von tierischen Zellkulturen quantitativ messen können nach Musmann [2016]. UV/Vis, ultraviolette und sichtbares Licht; MIR, NIR, mittlere beziehungsweise nahe Infrarotspektroskopie. ....	25
---	----

Tabelle 6: Ausgewählte Modellansätze zur Modellierung der Kultivierung tierischer Zellen diverser Arbeitsgruppen. MFA, Metabolic Flux Analysis; EFM, Elementary Flux Mode; PFA, Principal Factor Analysis; FBA, Flux Balance Analysis. ....	31
---	----



---

Tabelle 7: Zusammenfassung des allgemeinen Prozessablaufs der Fed-Batch Kultivierung. VZ, viable Zellzahlkonzentration; MTX, Methotrexat; PM, Produktionsmedium.....	36
Tabelle 8: Methode zur Elution während der Ionenaustauschchromatographie mittels Salz- und pH-Gradienten.....	40
Tabelle 9: Methode zur Elution während der hydrophoben Interaktionschromatographie.....	40
Tabelle 10: Zusammensetzung der Laufmittel für die Analyse der Aminosäuren.....	42
Tabelle 11: Methode zur Elution für die Analyse der Aminosäuren.....	42
Tabelle 12: Verwendete Modellparameter als Beispiel für die Lag-Phase der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 in Suspension. Exp., Experiment; Lit., Literatur. ....	56
Tabelle 13: Exemplarische Darstellung der Datengrundlage für die PLS-Regression. Prozessparameter ( $X_{V,min}$ ) und Zielvariable ( $X_{V,max}$ ) resultieren aus 100 Monte-Carlo-Simulationen. ....	64
Tabelle 14: Gemessene Konzentrationen der kommerziellen Kultivierungsmedien. PM, Produktionsmedium; FMA, Zufütterungsmedium A; FMB, Zufütterungsmedium B. ....	70
Tabelle 15: Übersicht aller Versuch mit dem Muster, welches die Zusammensetzung der Aminosäuren angibt. Plus bedeutet Zugabe, Minus bedeutet keine Zugabe und 0000 sind die Center Points in dreifacher Ausführung. Die Reihenfolge der Aminosäuren Glu, His, Met, Tyr stellt die Zugabe an Aminosäuren im Muster dar.....	72
Tabelle 16: Vergleich der Prozessvariablen während Fed-Batch (FB) und kontinuierlichen Kultivierungen.....	81
Tabelle 17: Klassifizierung der Nebenkompenten basierend auf deren Abtrennbarkeit und physikochemischen Eigenschaften. ....	93

---

## 10. Anhang

Tabelle A.1: Verwendete Modellparameter für die exponentielle Phase der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 in Suspension. Exp., Experiment.

Parameter	Beschreibung	Wert	Einheit	Referenz
$Y_{X/\text{glc}}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchter Glucose	1,57	$10^9$ Zellen $\text{mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{X/\text{gln}}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchtem Glutamin	9,36	$10^9$ Zellen $\text{mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Lactat zu verbrauchter Glucose	3,8	$\text{mmol mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{\text{amm}/\text{gln}}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Ammonium zu verbrauchtem Glutamin	0,665	$\text{mmol mmol}^{-1}$	Exp.
$Q_{\text{mAb}}$	Spezifische Produktbildungsrate	2,06	$10^{-12} \text{ g}_P \text{ Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Exp.

Tabelle A.2: Verwendete Modellparameter für die stationäre Phase der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 in Suspension. Exp., Experiment.

Parameter	Beschreibung	Wert	Einheit	Referenz
$Y_{X/\text{glc}}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchter Glucose	0,127	$10^9$ Zellen $\text{mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{X/\text{gln}}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchtem Glutamin	3,962	$10^9$ Zellen $\text{mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Lactat zu verbrauchter Glucose	0,091	$\text{mmol mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{\text{amm}/\text{gln}}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Ammonium zu verbrauchtem Glutamin	1,031	$\text{mmol mmol}^{-1}$	Exp.
$Q_{\text{mAb}}$	Spezifische Produktbildungsrate	1,04	$10^{-12} \text{ g}_P \text{ Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Exp.

Tabelle A.3: Verwendete Modellparameter für die Sterbephase der Fed-Batch Kultivierung von CHO DG44 in Suspension. Exp., Experiment.

Parameter	Beschreibung	Wert	Einheit	Referenz
$Y_{X/\text{glc}}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchter Glucose	2	$10^9$ Zellen $\text{mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{X/\text{gln}}$	Ausbeutekoeffizient gebildete Zellzahl zu verbrauchtem Glutamin	5,702	$10^9$ Zellen $\text{mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Lactat zu verbrauchter Glucose	0,001	$\text{mmol mmol}^{-1}$	Exp.
$Y_{\text{amm}/\text{gln}}$	Ausbeutekoeffizient gebildetes Ammonium zu verbrauchtem Glutamin	2,06	$\text{mmol mmol}^{-1}$	Exp.
$Q_{\text{mAb}}$	Spezifische Produktbildungsrate	1,07	$10^{-12} \text{ g}_P \text{ Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Exp.

Tabelle A.4: Identifizierte Peptide und deren korrespondierende Proteine, die mit Hilfe des LC-MS/MS aus einer vorangegangenen 2D-Gelelektrophorese der Kultivierungslösung einer Fed-Batch CHO DG44 Kultivierung analysiert wurden. MW, Molekulargewicht; pI, isoelektrischer Punkt laut der UniProt Datenbank der nicht modifizierten Proteine.

#	Gel MW	Gel pI	MW (UniProt)	pI (UniProt)	Primäre Zugangsnummer (UniProt)	Anzahl einzigartiger Peptide	Protein
1	25	7,2	25,76	6,45	A0A061HUZ2	9	Platelet-activating factor
			81,56	5,69	A0A061IN16	11	Glutathione S-transferase Mu 7-like protein
			25,88	6,43	A0A061HYZ1	9	Peroxiredoxin-6-like protein
2	25	7,9	30,28	7,22	A0A061IFC9	4	Carbonic anhydrase
			89,52	6,23	A0A061IJC4	4	Glutathione S-transferase Mu 1-like protein
			81,56	5,69	A0A061IN16	4	Glutathione S-transferase Mu 7-like protein
3	30	7,6	72,13	7,23	A0A098KXF7	8	Pyruvate kinase
			38,03	6,08	A0A061ILE8	6	Purine nucleoside phosphorylase-like protein
			32,23	9,11	A0A061IAK4	5	L-lactate dehydrogenase A chain
4	50	9,6	45,28	8,48	A0A061IB69	7	Fructose-bisphosphate aldolase
			72,13	7,23	A0A098KXF7	15	Pyruvate kinase
			102,7	6,02	A0A069C7Y3	5	Actin, cytoplasmic 1
5	25	6,6	27,39	6,34	A0A061I2E1	8	Proteasome subunit
			89,52	6,23	A0A061IJC4	8	Glutathione S-transferase Mu 1-like protein
			81,56	5,69	A0A061IN16	8	Glutathione S-transferase Mu 7-like protein
6	45	6,7	50,57	5,93	G3GR73	11	Rab GDP diss. inhib.
			52,79	6	A0A098KXB1	10	Cytosol aminopeptidase-like protein
			44,67	7,54	A0A061IJI8	9	Alpha-enolase
7	50	6,1	52,79	6	A0A098KXB1	20	Aminopeptidase
			72,13	7,23	A0A098KXF7	29	Pyruvate kinase
			145,1	8,37	A0A061HU29	15	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
8	57	6	73,86	5,56	A0A061I5D1	22	Heat shock protein
			74,72	5,29	A0A061HWC7	9	Plastin-3
			69,64	5,57	A0A061I5U1	9	Heat shock-related protein 2
9	80	6,1	72,13	7,23	A0A098KXF7	11	Pyruvate kinase
			117,7	5,42	G3IBG3	8	Ubiquitin activating enzyme E1
			73,86	5,56	A0A061I5D1	7	Heat shock protein
10	70	5,6	73,86	5,56	A0A061I5D1	9	Heat shock protein
			68,43	5,55	A0A061I1Q2	5	Vitamin K-dependent protein S
			85,71	5,2	A0A061IAX6	5	Dipeptidyl peptidase 3
11	25	6	25,88	6,43	A0A061HYZ1	9	Peroxiredoxin
			89,52	6,23	A0A061IJC4	19	Glutathione S-transferase Mu 1-like protein
			81,56	5,69	A0A061IN16	14	Glutathione S-transferase Mu 7-like protein
12	55	7,8	72,13	7,23	A0A098KXF7	37	Pyruvate kinase
			52,79	6	A0A098KXB1	10	Cytosol aminopeptidase-like protein
			73,86	5,56	A0A061I5D1	4	Heat shock protein
13	50	8,6	52,79	6	A0A098KXB1	4	Cytosol aminopeptidase-like protein
			72,13	7,23	A0A098KXF7	19	Pyruvate kinase
			145,1	8,37	A0A061HU29	2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
14	50	9,2	72,13	7,23	A0A098KXF7	20	Pyruvate kinase
			44,67	7,54	A0A061IJI8	3	Alpha-enolase
			42,69	8,78	A0A061HV36	3	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like protein

# Martin Kornecki



## Persönliches

Geburtstag: 17.10.1990  
Geburtsort: 97980 Bad Mergentheim

## Ausbildung

- 10/2013 bis 04/2016 Master of Science (M. Sc.)  
Biotechnologie  
Schwerpunkt: Bioverfahrenstechnik  
Technische Universität Braunschweig  
Titel der Masterarbeit: Optimierung der Biokatalyse mit Chloroperoxidase – Enzym- und Prozessentwicklung
- 10/2010 bis 09/2013 Bachelor of Science (B. Sc.)  
Biotechnologie  
Schwerpunkt: Bioverfahrenstechnik  
Technische Universität Braunschweig  
Titel der Bachelorarbeit: Prozessoptimierung der Produktion von Chymosin mit der Hilfe von Mikropartikel-unterstützter Kultivierung von *Aspergillus awamori*

## Berufserfahrung

- 09/2019 bis heute Betriebsingenieur (Plant Engineer)  
Novartis Manufacturing GmbH  
Marburg
- 05/2016 bis 06/2019 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand)  
Technische Universität Clausthal  
Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik
- 06/2016 Projektleiterkurs nach § 15 GenTSV  
Bochum
- 01/2015 bis 03/2015 DECHEMA Forschungsinstitut  
Frankfurt am Main  
Praktikum in der Arbeitsgruppe Industrielle Biotechnologie
- 04/2014 bis 06/2014 Institut für Bioverfahrenstechnik  
Technische Universität Braunschweig  
Hilfswissenschaftler